

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI “*FEDERICO II*”



DIPARTIMENTO DI FARMACIA

**DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZA DEL FARMACO
XXVI CICLO**

**SINTESI DI NUOVI LIGANDI PER I RECETTORI
SEROTONINERGICI 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2C}
E LORO VALUTAZIONE FARMACOLOGICA**

Coordinatore

Prof.ssa Maria Valeria D'Auria

Tutor Universitario

Dott. Ferdinando Fiorino

Candidato

Dott. Antonio Ciano

INTRODUZIONE	2
LA SEROTONINA.....	3
AZIONI CENTRALI E PERIFERICHE DELLA SEROTONINA.....	7
RECETTORI SEROTONINERGICI.....	12
Recettori 5-HT ₁	14
Recettori 5-HT ₂	18
Recettori 5-HT ₃	21
Recettori 5-HT ₄	21
IMPOSTAZIONE DELLA RICERCA	23
PARTE SPERIMENTALE	30
PROCEDURE SPERIMENTALI DELLE SINTESI	36
DERIVATI A NUCLEO N'-CIANOPICOLINAMIDINICO	36
DERIVATI A NUCLEO ISONICOTINICO	40
DERIVATI A NUCLEO PICOLINICO	46
CARATTERIZZAZIONE	52
SPERIMENTAZIONE FARMACOLOGICA	78
RISULTATI E DISCUSSIONE	86
DERIVATI A NUCLEO N'-CIANOPICOLINAMIDINICO (4a-q).....	87
DERIVATI A NUCLEO ISONICOTINICO (7a-v e 8a-v)	92
SAGGI FUNZIONALI SU ILEO DI RATTO.....	100
CONCLUSIONI	109
BIBLIOGRAFIA	114

INTRODUZIONE

LA SEROTONINA

La serotonina (5-idrossitriptamina, 5-HT, Figura 1) è stata isolata, purificata e cristallizzata per la prima volta nel 1948 e deve il suo nome all'unione dei termini "siero" e "tono", poiché capace di regolare il tono dei vasi sanguigni. È un'ammina biogena a basso peso molecolare, che chimicamente corrisponde al 3-(β -amminoetil)-5-idrossi-indolo, le cui quantità endogene nell'uomo sono pari a circa 10 mg, di cui il 90% è localizzato nelle cellule enterocromaffini del tratto gastrointestinale, l'8% nelle piastrine e circa il 2% è distribuito in diverse aree del sistema nervoso centrale, dove funge da neurotrasmettitore [1].

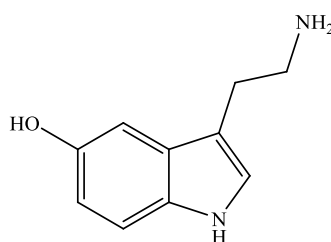


Figura 1. Formula di struttura della serotonina

La serotonina, infatti, è uno dei neurotrasmettitori maggiormente conservati nel processo evolutivo e con il passare del tempo le sue funzioni si sono rivelate sempre più interconnesse con gli altri neurotrasmettitori, sia del sistema nervoso centrale, che di quello periferico. A livello centrale, ricopre un ruolo di primaria importanza nella modulazione dell'umore, dell'appetito, degli stimoli sessuali, della memoria, delle emozioni e nell'ansia [2]. A livello periferico, invece, agisce come ormone locale in alcuni distretti, quali il tratto gastrointestinale, il sistema cardiovascolare ed immunitario. Tale molteplicità di funzioni suggerisce che la serotonina è coinvolta in un'ampia serie di processi fisiologici e fisiopatologici del nostro organismo, tanto che oggi i ligandi serotoninergici

vengono impiegati per il trattamento dei disturbi depressivi, psicotici e di una serie di patologie a carico del sistema cardiovascolare.

La biosintesi della 5-HT endogena segue una via simile a quella della noradrenalina, con l'unica differenza che l'amminoacido precursore è il triptofano, invece della tirosina. Il triptofano inizialmente viene assorbito nell'intestino tenue e successivamente viene captato attivamente dalle cellule cerebrali attraverso una proteina carrier in grado di trasportare anche altri aminoacidi neutri di grosse dimensioni e con catene ramificate. A questo punto, a livello centrale, il triptofano subisce ossidrilazione sull'anello indolico e viene convertito in 5-idrossitriptofano (5-HTP) per opera della triptofano-idrossilasi (TPH), un'ossidasi a funzione mista che per svolgere normalmente l'attività richiede ossigeno molecolare e tetraidrobiopterina (BPH_4), un cofattore pteridinico in forma ridotta. Il secondo step sintetico prevede la conversione del 5-idrossitriptofano in 5-HT, ad opera della triptofano decarbossilasi (TPDC), una decarbossilasi degli L-aminoacidi, con un'ampia specificità di substrato (Figura 2).

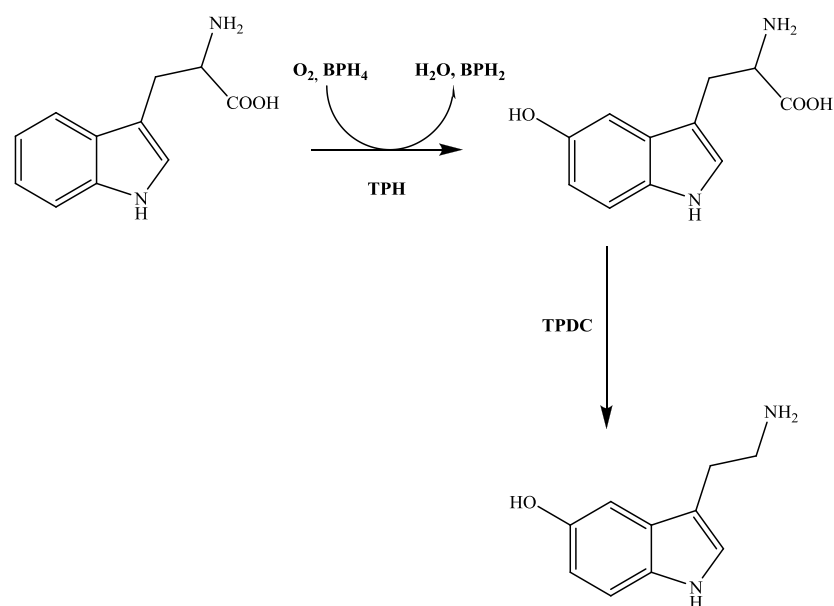


Figura 2. Metabolismo del triptofano a serotonina

Il prodotto sintetizzato, la 5-HT, viene immagazzinato in granuli secretori da un trasportatore vescicolare; la 5-HT immagazzinata viene rilasciata attraverso esocitosi da specifici neuroni serotoninergici. Nel sistema nervoso, l'azione della 5-HT rilasciata viene infine interrotta mediante la ricaptazione neuronale della stessa, attraverso un trasportatore specifico Na^+ -dipendente. Tale trasportatore è localizzato nella membrana delle terminazioni assoniche dei neuroni serotoninergici (dove si esaurisce l'azione della 5-HT a livello della sinapsi) ed a livello delle membrane piastriniche (dove avviene la captazione della 5-HT dal sangue).

La principale via metabolica della 5-HT coinvolge una deaminazione ossidativa per mezzo della monoamino-ossidasi (MAO), fornendo la 5-idrossiindolo-acetaldeide; che viene successivamente trasformata in acido 5-idrossi-indolacetico (5-HIAA) da un enzima ubiquitario, l'aldeide deidrogenasi. È stata suggerita l'esistenza anche di altre vie minori di metabolizzazione della 5-HT, come la solfatazione e la *O*- e *N*-metilazione [3].

Relativamente alla sua localizzazione, studi sperimentali hanno evidenziato dettagli circa la distribuzione della serotonina nelle varie aree cerebrali, rivelando che essa è particolarmente concentrata a livello dell'ipotalamo, del mesencefalo e del sistema limbico [4].

Nell'ipotalamo, in particolare, le massime concentrazioni di 5-HT sono state individuate nell'eminenza mediana, nel nucleo arcuato, nel nucleo soprachiasmatico e nel nucleo preottico-soprachiasmatico [5].

Nel SNC le vie serotoninergiche presentano una distribuzione topografica analoga a quella delle vie noradrenergiche. I corpi cellulari, infatti, sono localizzati nel segmento inferiore del tronco encefalico (ponte bulbo), a livello dei nuclei del rafe. Da qui si

dipartono sia vie ascendenti, che innervano aree corticali e sottocorticali, sia discendenti, che terminano nel midollo spinale [6-7].

Neuroni serotoninergici sono stati documentati in molte altre aree cerebrali: nel sistema extrapiramidale e nelle diverse aree deputate al controllo della funzione cardiovascolare. In particolare, le connessioni dei nuclei ad irradiazione serotoninergica, a partire dal tronco encefalico, appaiono ampie e molteplici, estendendosi dalle strutture limbiche, alla corteccia cerebrale ed al cervelletto. Oltre che nel sistema nervoso centrale, i neuroni serotoninergici sono presenti nelle stazioni gangliari, dove svolgono una funzione modulatoria sulla trasmissione nervosa verso lo stomaco, l'intestino, il cuore, i vasi, ecc. [8].

I metodi fluorimetrici, la cromatografia liquida e le tecniche d'immunoistochimica hanno dimostrato la presenza di grandi quantità di serotonina nei corpi carotidei di diverse specie animali, compreso l'uomo. Ricerche sperimentali su tessuti privati dei vasi hanno dimostrato che la serotonina può essere ricaptata, accumulata e rilasciata dalle terminazioni simpatiche. Nelle vescicole delle fibre simpatiche che raggiungono l'ipofisi, la serotonina è conservata insieme alla noradrenalina; ciò ha fornito la prima dimostrazione di come una cellula nervosa possa contenere più di un neurotrasmettitore. Resta da stabilire quale precisa influenza sulle attività vascolari abbia *in vivo* la serotonina accumulata ed eventualmente rilasciata dalle terminazioni simpatiche [9].

AZIONI CENTRALI E PERIFERICHE DELLA SEROTONINA

È noto che la serotonina partecipa alla regolazione della liberazione di ormoni, particolarmente di quelli ipofisari, come l'ormone somatotropo, la prolattina, la corticotropina e la tireotropina. Sono noti, inoltre, effetti inibitori sul comportamento sessuale in parte dovuti all'inibizione nella produzione degli ormoni coinvolti.

La 5-HT sembra svolgere un'importante azione antinocicettiva a livello spinale, nonché un interessante ruolo di attivazione del sonno ed effetti sul controllo del vomito e dell'umore. È ormai ben dimostrato il suo coinvolgimento, unitamente alle catecolamine e a numerosi peptidi, nella regolazione centrale delle sensazioni connesse all'assunzione del cibo; tuttavia non risulta perfettamente chiaro quale sia il sito o i siti in cui tale azione viene esplicata [10].

La 5-HT partecipa anche ai meccanismi centrali di termoregolazione, nonostante il suo ruolo non sia perfettamente chiaro, tenuto conto che studi farmacologici mostrano effetti sia ipertermici che ipotermici, a seconda delle condizioni sperimentali adottate.

Un recente studio ha dimostrato il forte coinvolgimento della serotonina anche nei meccanismi alla base della respirazione, in quanto le proiezioni dei nuclei dorsali del rafe si estendono fino alle regioni pontine e ventrali respiratorie, dove la 5-HT esercita un'azione broncocostrittrice ed altera la frequenza respiratoria [11].

Infine, un'alterata regolazione della trasmissione serotoninergica incide su numerosi aspetti comportamentali e può risultare alla base di patologie neuropsichiatriche come ad esempio la schizofrenia, l'ansia, lo stress, la depressione. Per questo motivo, molte sostanze che modulano il sistema serotoninergico sono alla base dei trattamenti farmacologici per queste patologie [12-14]. Inoltre, il sistema serotoninergico è

funzionalmente connesso anche ad altri sistemi, come quello noradrenergico e quello melatoninergico. Basti pensare che il *locus coeruleus* (la principale fonte di proiezioni noradrenergiche a livello centrale) è fortemente innervato da fibre serotoninergiche derivanti dal nucleo dorsale del rafe [15], tanto che la stimolazione dei recettori serotoninergici centrali causa una riduzione dell'attività delle cellule noradrenergiche nel *locus coeruleus* [16], mentre una diminuita attività serotoninergica si riflette con un aumento del “*firing*” (stimolazione) neuronale noradrenergico [17]. Un ulteriore controllo della trasmissione serotoninergica e noradrenergica è affidato ai neuroni del nucleo centrale dell'amigdala (CeA), le cui proiezioni giungono fino al nucleo dorsale del rafe ed al *locus coeruleus* [18], anche se ad oggi non sono ancora completamente chiari i meccanismi molecolari alla base di tale controllo.

Allo stesso modo, alterate concentrazioni di serotonina a livello centrale possono causare deficit anche a carico del sistema melatoninergico. La melatonina, infatti, prodotta dalla ghiandola pineale è alla base della regolazione dei ritmi circadiani e viene sintetizzata nel SNC a partire dalla serotonina. In condizioni fisiologiche, la massima produzione di melatonina si registra di notte e causa l'inibizione della produzione e della liberazione di dopamina: tale variazione ritmica delle concentrazioni di questi neurotrasmettitori prende appunto il nome di ritmo circadiano. È stato inoltre dimostrato che la somministrazione esogena di melatonina nei ratti causa un aumento dell'attività della triptofano idrossilasi, enzima coinvolto nella sintesi della serotonina [19]. Appare pertanto evidente che un deficit nella produzione della serotonina possa direttamente influenzare anche il sistema melatoninergico, in quanto la serotonina è il precursore biologico della melatonina stessa.

Gli effetti periferici prodotti da dosi farmacologiche di tale ammina sono complessi, essendo la risultante sia di azioni dirette che mediate dalla modulazione di altri

neurotrasmettitori come la noradrenalina e l'acetilcolina. In particolare, alcuni degli effetti farmacologici della serotonina sono l'aumento della motilità dell'intestino tenue, la riduzione di quella dello stomaco e del colon, la broncocostrizione, la contrazione dell'utero e l'aumento della frequenza respiratoria.

Inoltre, stanno emergendo evidenze riguardo un coinvolgimento di questo neurotrasmettitore in patologie come l'autismo, il morbo di Alzheimer, l'epilessia e il cancro. Infatti, recentemente è stato riscontrato che la serotonina viene prodotta in eccesso dalla maggior parte dei tumori carcinoidi, per cui la misura dell'escrezione nelle 24 ore di uno dei suoi principali metaboliti, l'acido 5-idrossi-indolacetico, può essere usata come test diagnostico per questo tipo di patologia.

La serotonina ematica, sia quella depositata nelle terminazioni simpatiche della parete vascolare che quella impegnata nella neurotrasmissione fra le aree centrali deputate al controllo delle funzioni cardiovascolari, interviene attivamente nella regolazione delle variabili cardiache e vascolari. È stato, infatti, ampiamente documentato che la serotonina partecipa, tramite il suo complesso sistema recettoriale, alla regolazione del tono vasale, della permeabilità capillare, dell'emostasi e dell'aggregazione piastrinica. Quindi, la serotonina svolgerebbe un ruolo importante anche in diverse condizioni patologiche che colpiscono l'apparato cardiovascolare.

Nell'uomo l'azione della serotonina sul sistema circolatorio è variabile, considerando che l'attivazione dei meccanismi serotoninergici può causare sia vasodilatazione a livello dei muscoli scheletrici sia potente vasocostrizione [20].

La serotonina è in grado di indurre vasodilatazione non solo mediante liberazione dalle cellule endoteliali di EDRF (*Endothelium derived releasing factor*) e prostaciclina

(PGI₂), ma anche mediante stimolazione dei recettori 5-HT₁ sulle terminazioni nervose simpatiche, a livello della muscolatura liscia di alcuni vasi, con conseguente inibizione della liberazione di noradrenalina [21].

La 5-idrossitriptamina determina, invece, vasocostrizione mediante i seguenti effetti:

- azione diretta sui recettori 5-HT₂ della muscolatura liscia vascolare;
- amplificazione degli effetti di altri agonisti vasocostrittori come la noradrenalina, l'istamina e l'angiotensina II;
- stimolazione del rilascio di noradrenalina dalle terminazioni adrenergiche.

La serotonina induce una triplice risposta sulla pressione arteriosa:

1. iniziale transitoria ipotensione, sostenuta dalla stimolazione dei recettori 5-HT₃;
2. fase ipertensiva, dovuta all'effetto diretto della serotonina sui vasi con l'aumento delle resistenze periferiche e dell'output cardiaco, mediata dai recettori 5-HT₂;
3. fase ipotensiva finale, sostenuta dalla vasodilatazione muscolare scheletrica e dall'inibizione dei riflessi vagali, mediata dai recettori 5-HT₁.

Sul cuore, invece, la serotonina, sintetizzata anche *in situ*, esercita effetti inotropi e cronotropi positivi mediati dai recettori 5-HT₁.

È probabile inoltre che la 5-HT, captata dal sangue e trasportata nelle piastrine, sia coinvolta nell'aggregazione e nel processo di emostasi [1,4].

Sebbene ad oggi non ci siano prove certe riguardo il coinvolgimento della serotonina nelle disfunzioni sessuali, è opinione comune che questa ammina biogena possa avere un ruolo di primaria importanza anche a livello dell'apparato riproduttore: l'ipotesi che la 5-HT sia un modulatore negativo degli stimoli sessuali (soprattutto femminili) [22]

sembra essere stata confermata anche da un recente studio sul polimorfismo genetico associato ai disturbi del desiderio sessuale [23]. Inoltre, alterazioni a carico del sistema serotoninergico sembrano esacerbare le disfunzioni sessuali causate dall'utilizzo cronico di antidepressivi come gli inibitori selettivi del reuptake della serotonina (SSRI) [24-26].

Concludendo, è possibile affermare che il sistema serotoninergico dei vertebrati è in grado di influenzare quasi tutte le funzioni basali e fisiologiche dei mammiferi, dalla regolazione del sistema cardiovascolare, della respirazione e del sistema gastrointestinale alla termoregolazione. Inoltre, è coinvolto nel mantenimento del ritmo circadiano e nel controllo dell'appetito, dell'aggressività, del comportamento sessuale, dell'umore, dell'apprendimento, della memoria, del sonno e della sensibilità al dolore. Dato il suo coinvolgimento in un così ampio numero di funzioni fisiologiche, è facile dedurre che la serotonina sia anche coinvolta in un altrettanto ampio numero di processi patologici.

RECETTORI SEROTONINERGICI

La grande varietà di funzioni che vedono il coinvolgimento della serotonina si riflette nella complessità farmacologica dei suoi recettori.

Come dimostrato sperimentalmente, l'effetto stimolante o inibente della 5-HT nei vari distretti dell'organismo è in relazione al sito e al tipo di recettore serotoninergico interessato. La più recente classificazione dei recettori serotoninergici, proposta dalla IUPHAR nel 1998 e tutt'oggi ancora attuale, suggerisce la suddivisione in base alle caratteristiche farmacologiche, strutturali e trasduzionali in sette classi: 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT₅, 5-HT₆ e 5-HT₇; a ciascun tipo di recettore appartengono diversi sottotipi recettoriali, distinguibili a loro volta dal punto di vista farmacologico e molecolare (Tabella 1) [27]. Tali recettori appartengono alla famiglia dei recettori accoppiati a proteine G (*G protein coupled receptor*, *GPCR*), eccezion fatta per il sottotipo recettoriale 5-HT₃ che è un canale ionico che permette il flusso di ioni Na⁺ e K⁺. Inoltre, i recettori metabotropici (5-HT₁, 5-HT₂ e 5-HT₄₋₇) sono stati classificati come recettori appartenenti alla superfamiglia di recettori rodopsina-simili di tipo A [28]. Ogni recettore presenta diversi sottotipi recettoriali e, ad oggi, è possibile distinguere 15 diverse sottoclassi (Tabella 1): le differenze funzionali relative ai vari sottotipi recettoriali sono riconducibili agli effetti stimolatori o inibitori dei secondi messaggeri sottesi alle proteine G. Tuttavia, tutti questi recettori presentano una similitudine strutturale, data dalla presenza di sette eliche transmembranarie, con un dominio ammino-terminale extracellulare ed uno carbossi-terminale intracellulare.

Tabella 1. Caratteristiche dei recettori serotoninergici.

Nome	Effettore	Distribuzione	Agonista*	Antagonista	Patologia**
5-HT _{1A}	G _i /G _o	Ippocampo, setto, terminali nervosi	8-OH-DPAT Buspirona Ipsapirone Flesinoxan	WAY100135 WAY100635 Spiperone	Ansia, ipertensione
	cAMP↓ PLC↑ Canali K ⁺	Amigdala, Rafe, plesso mioenterico			
5-HT _{1B}	G _i /G _o cAMP↓ PLC↑	Striato, Ippocampo, S. nigra, vasi terminali sinaptici del sistema autonomo	CP93129 L694247 RU24969 Sumatriptan	GR5562 SB224289 Cianopindolo Metiotepina	Aggressività Ansia Depressione
5-HT _{1D}	G _i /G _o cAMP↓ PLC↑	Striato, Accumbens Ippocampo, Rafe, n. della base, ganglio trigemino, muscolatura vasale	L694247 Triptani	GR127935 BRL15572 Metiotepina	Emicrania Depressione Vasculopatie
5-HT _{1E}	G _i /G _o cAMP↓	Caudato, Putamen, Amigdala, Corteccia	5-CT	Metiotepina	----
5-HT _{1F}	G _i /G _o cAMP↓	Corteccia, Talamo, bulbo olfattorio, midollo spinale, utero, mesentero	L7334370 LY344864 Triptani	----	Emicrania
5-HT _{2A}	G _q /G ₁₁ PLC↑	Corteccia, Ippocampo, bulbo olfattorio, midollo spinale, sist. gastrointestinale, musc. vasale e bronchiale, endotelio, piastrine	α-metil-5-HT DOI, DOB, Quipazina	Ritanserina Ketanserina Ciproptadina Trazodone Risperidone Clozapina Metisergide Mirtazapina	Ipertensione Alterazione motilità intestinale
5-HT _{2B}	G _q /G ₁₁ PLC↑	Muscolatura ileale, stomaco, utero, vasi, endotelio	BW723686	SB204741	----
5-HT _{2C} ***	G _q /G ₁₁ PLC↑	Plessi coroidi, Ponte, Striato, Ippocampo, Ipotalamo, endotelio, midollo spinale	α-metil-5-HT Quipazina Lorcaserina	Mesulergina Metisergide Clozapina Olanzapina	Emicrania Ansia
5-HT _{3A} 5-HT _{3B} 5-HT _{3C}	Canale cationico	Striato, Ippocampo, S. nigra, gangli simpatici, neuroni sensitivi	2-metil-5-HT m-clorofenil-biguanide	Tropisetron Ondansetron Granisetron	Vomito
5-HT ₄	G _s cAMP↑ Canali del Ca ²⁺ ↑ Canali K ⁺ ↓	Striato, Talamo, Ippocampo, bulbo olfattorio, plesso mioenterico, musc. esofagea e vasale	Prucalopride Mosapride Renzapide Cisapride Tegaserod	GR113808 SB207226 RS100235	Stipsi
5-HT _{5A}	G _i /G _o cAMP↓	Ippocampo, Corteccia, Cervelletto, Abenula, midollo spinale	5-CT	Ritanserina	----
5-HT _{5B}	----	Ippocampo, Corteccia, Cervelletto, bulbo olfattorio, midollo spinale	----	----	----
5-HT ₆	G _s cAMP↑	Caudato, Putamen, Accumbens, Corteccia, Ippocampo, ganglio cervicale sup.	----	Ro046790 SB271046	Psicosi
5-HT ₇	G _s cAMP↑ Canali Ca ²⁺ ↑	Ippocampo, Ipotalamo, Talamo, Collicolo sup., Rafe, gangli simpatici. Musc. vasale e intestinale	8-OH-DPAT 5-CT Sumatriptan	SB258719 Clozapina	Ipertensione

* Agonisti ed antagonisti con maggiore selettività; la maggior parte di questi farmaci è in fase sperimentale.

** Vengono indicate le principali applicazioni cliniche dei farmaci attivi sul sottotipo recettoriale.

*** Il recettore 5-HT_{2C} era precedentemente chiamato 5-HT_{1C}.

Recettori 5-HT₁

Tutti i recettori 5-HT₁ finora individuati mostrano alcune caratteristiche comuni nei loro siti attivi di legame, come la presenza di sette domini transmembranari e l'accoppiamento negativo all'adenilato ciclasi attraverso proteine G inibitorie. Tra questi, il recettore 5-HT_{1A} attiva anche un canale per il K⁺ ligando-dipendente e inibisce un canale per il Ca²⁺ voltaggio-dipendente [3].

Tutti i recettori 5-HT₁ regolano essenzialmente le seguenti funzioni:

1. inibizione nel sistema nervoso della liberazione di noradrenalina e acetilcolina;
2. inibizione del rilascio di serotonina (5-HT_{1A} presinaptici localizzati all'interno dei nuclei del rafe)
3. influenza su alcune funzioni controllate dal SNC quali il comportamento, l'attività cardiovascolare e gastrointestinale;
4. vasodilatazione a livello cardiovascolare (solo in rari casi vasocostrizione) con ipotensione arteriosa, aumento del flusso aortico e tachicardia.

Considerando nello specifico i sottotipi recettoriali 5-HT_{1A}, essi sono ampiamente distribuiti nel sistema limbico e sono coinvolti nella modulazione delle emozioni [29] (Figura 3).

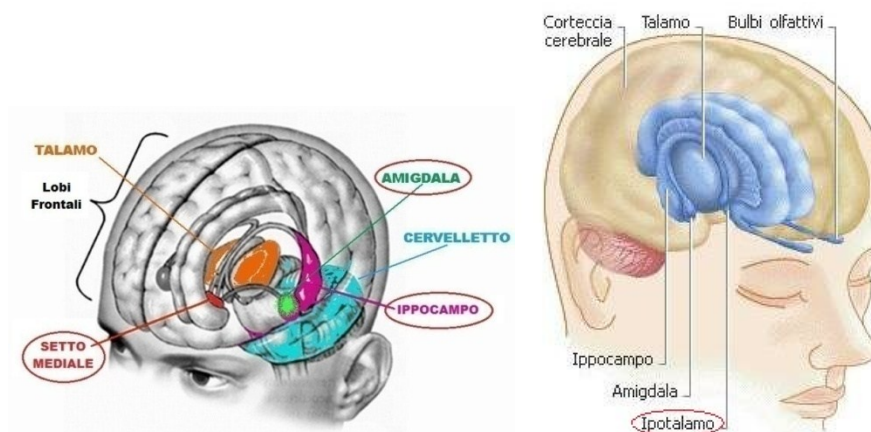


Figura 3. Localizzazione dei recettori 5-HT_{1A}

Il sottotipo 5-HT_{1A} funge inoltre da autocettore a livello delle sinapsi serotoninergiche e da eterocettore in un gran numero di sinapsi non serotoninergiche. È stato inoltre dimostrato anche un suo ruolo protettivo nei processi di degenerazione e di apoptosi neuronale [30,31]. La sua localizzazione nelle regioni cerebrali associate con l'apprendimento e la memoria, come l'ippocampo, la corteccia frontale e la corteccia entorinale permette la modulazione diretta ed indiretta dei vari sistemi di neurotrasmissione coinvolti nelle funzioni cognitive: infatti è stato dimostrato che l'8-idrossi-2-*N,N*-dipropilammin-tetralina (8-OH-DPAT), agonista 5-HT_{1A}, causa un peggioramento delle funzioni cognitive e di apprendimento in vari modelli murini [32].

Altrettanto interessante è il ruolo che tale sottotipo recettoriale ricopre nel trattamento dell'ansia: alcuni agonisti 5-HT_{1A} (ad es. flesinoxan, lesopitron) hanno mostrato un profilo ansiolitico paragonabile a quello delle benzodiazepine per azione sui recettori 5-HT_{1A} postsinaptici nelle aree limbiche centrali e sono attualmente in fase II/III della sperimentazione clinica [33]. Inoltre, negli ultimi decenni, l'attenzione della comunità scientifica si è incentrata sul ruolo del recettore 5-HT_{1A} nel trattamento dei disturbi depressivi maggiori, ma ad oggi non è ancora chiaro il meccanismo molecolare

alla base dell'azione antidepressiva dei ligandi serotoninergici, probabilmente a causa della complessa organizzazione recettoriale all'interno del SNC. Infatti, è possibile distinguere due popolazioni di recettori 5-HT_{1A}: gli autocettori presinaptici localizzati all'interno dei nuclei del rafe e quelli postsinaptici, presenti nell'ippocampo, nell'amigdala, nel setto e nelle aree limbiche [34]. I primi, mediante un meccanismo a feedback negativo, aiutano a mantenere l'omeostasi del sistema stesso, i secondi rientrano invece in tutti quei meccanismi emozionali solitamente colpiti dalla patologia depressiva. Pertanto, alla luce di quanto esposto, appare evidente che il miglior profilo farmacologico per il trattamento della depressione è quello posseduto da un'agonista 5-HT_{1A} postsinaptico, in quanto, un agonista a livello presinaptico causerebbe un effetto esattamente opposto a quello antidepressivo. In realtà, un recente approccio farmacologico prevede l'utilizzo di agonisti pieni 5-HT_{1A} (buspirone, flesinoxan) per il trattamento dei disturbi depressivi, in quanto tali ligandi sarebbero in grado di desensibilizzare i recettori presinaptici serotoninergici, causando un aumento dei livelli di 5-HT nel vallo sinaptico ed un miglioramento dei sintomi depressivi [35].

Recentemente, è stato anche approfondito il ruolo del sottotipo recettoriale 5-HT_{1A} nel trattamento coadiuvante di alcune patologie, quali schizofrenia e Parkinson. Nel trattamento dei disturbi bipolari, infatti, l'utilizzo di agonisti 5-HT_{1A} sembra alleviare i disordini affettivi e cognitivi, caratteristici dell'utilizzo degli antagonisti D₂ [36]. Infatti è ormai da anni disponibile in commercio per la cura della schizofrenia l'aripirazolo, molecola a struttura arilpiperazinica, dotata di attività D₂ antagonista/5-HT_{1A} agonista, dotata di minori effetti collaterali rispetto ai classici antipsicotici ad attività dopaminergica. Allo stesso modo, l'utilizzo di agonisti 5-HT_{1A} nella terapia antiparkinson ha mostrato una riduzione della discinesia indotta da L-DOPA causata dall'utilizzo di agonisti

dopaminergici in modelli di primati e murini [37,38].

Infine, evidenze suggeriscono il coinvolgimento di questo sottotipo recettoriale anche nella proliferazione dei carcinomi, in particolare del carcinoma polmonare a piccole cellule (SCLC) [39] ed in quello prostatico [40]. Nelle linee cellulari di carcinoma polmonare a piccole cellule, è stato infatti evidenziato un eccessivo rilascio di 5-HT, che sembra essere coinvolta in un *loop* autocrino di fattori di crescita, favorendo la proliferazione cellulare: è ormai noto che le cellule di origine neuroendocrina secernono fattori di crescita (tra cui appunto la serotonina ed alcuni neuropeptidi) che vanno ad agire sulle cellule adiacenti, favorendo la proliferazione del tumore e la metastatizzazione [41].

Nel carcinoma prostatico, invece, è stato dimostrato che la serotonina, agendo sui recettori 5-HT_{1A}, induce la proliferazione cellulare in maniera dose-dipendente e l'utilizzo di antagonisti di questo sottotipo recettoriale, come il NAN-190, inibisce la crescita cellulare in maniera dose-dipendente [42]. Inoltre, dato che i recettori serotoninergici 5-HT_{1A} si differenziano strutturalmente dagli altri sottotipi recettoriali serotoninergici, ma mostrano un alto grado di omologia con i recettori adrenergici, numerosi ligandi adrenergici si legano con elevata affinità ai recettori 5-HT_{1A} [43], come ad esempio la doxazosina, un farmaco anti-adrenergico, che è in grado di inibire la proliferazione delle cellule di tumore prostatico (PC3) e di tumore alla vescica (HT1376), agendo come antagonista dei recettori 5-HT_{1A} [44].

Il sottotipo recettoriale 5-HT_{1D}, espresso anch'esso sulla membrana delle cellule PC3, sembra implicato in un effetto di migliore vascolarizzazione del tumore, essendo collocato in grande quantità sulle pareti delle cellule vasali dell'area tumorale [45], provocandone vasodilatazione.

Recettori 5-HT₂

Riguardo ai recettori 5-HT₂, essi producono un aumento dell'idrolisi del fosfatidil-inositolo mediante accoppiamento a proteine G_q. Fino a poco tempo fa non esistevano prove a sostegno della loro eterogeneità, ma ad oggi sono stati identificati tre sottotipi recettoriale, particolarmente diffusi sia a livello centrale che periferico, che mediano molte delle azioni della 5-HT. L'elevato grado di omologia tra i recettori 5-HT_{1C} e 5-HT₂, insieme ad un comune sistema di trasduzione (ciclo del fosfatidil-inositolo), ha indotto a considerare il recettore 5-HT_{1C} come un sottotipo recettoriale 5-HT₂. Infatti, secondo il più recente sistema di nomenclatura, i 5-HT_{1C} sono ora definiti come 5-HT_{2C}, mentre i "classici" recettori 5-HT₂ e 5-HT_{2F} sono chiamati rispettivamente 5-HT_{2A} e 5-HT_{2B}.

I recettori 5-HT_{2A} sono ampiamente distribuiti nel SNC, soprattutto nelle zone di terminazione degli assoni serotoninergici. In particolare, si sono trovate alte concentrazioni di recettori 5-HT_{2A} nella corteccia prefrontale, parietale e somato-sensoriale e nel claustrum. Inoltre, tale sottotipo recettoriale è anche largamente distribuito nei tessuti periferici e nelle piastrine [3].

La stimolazione dei sottotipi recettoriali 5-HT_{2A} [46,47] media le seguenti azioni farmacologiche:

1. depolarizzazione di motoneuroni nel sistema nervoso;
2. vasocostrizione;
3. contrazione della muscolatura liscia gastrointestinale, bronchiale, urogenitale;
4. attivazione dell'aggregazione piastrinica ed aumento della permeabilità capillare.

Gli antagonisti dei recettori 5-HT_{2A} (ketanserina, pirenperone e spiperone), che agiscono anche su recettori non serotoninergici come l' α -adrenocettore, il recettore istaminergico, dopaminergico e muscarinico, sono usati nella terapia dell'ipertensione. La ketanserina è anche in grado di inibire la broncocostrizione da adenosina. Recenti studi hanno, inoltre, dimostrato il coinvolgimento dei recettori 5-HT_{2A} nelle linee cellulari del carcinoma della mammella sottolineando il potenziale utilizzo terapeutico come antitumorali e la contemporanea necessità di antagonisti altamente selettivi per tale sottotipo recettoriale [48].

Il sottotipo recettoriale 5-HT_{2A} è ampiamente diffuso nelle cellule circolari e longitudinali della muscolatura liscia del tratto gastrointestinale, dove, oltre a promuovere la peristalsi intestinale, è responsabile dello sviluppo e della sopravvivenza delle cellule muscolari ed epiteliali [49]. Infatti, è stato ampiamente dimostrato che i recettori serotoninergici sono responsabili della crescita dei recettori dopaminergici all'interno del Sistema Nervoso Enterico, che a loro volta rallentano la motilità intestinale [50,51]. In particolare, la serotonina da un lato promuove il transito intestinale, dall'altro favorisce il rilascio di dopamina che è un modulatore negativo della peristalsi gastroenterica [50]. Appare pertanto evidente che variazioni dei livelli di 5-HT possano condurre a stati patologici a carico dell'apparato digerente.

Altrettanto interessante è l'effetto mediato dai recettori 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C} sulle pulsioni e sulle funzioni sessuali: in modelli murini femminili tali sottotipi recettoriali sembrano favorire il comportamento di lordosi (l'assunzione di una postura che esponga i genitali al maschio) e l'accoppiamento [52,53], antagonizzando gli effetti del sottotipo recettoriale 5-HT_{1A} ad attività inibitoria. In modelli murini maschili, invece, tali sottotipi

recettoriali sembrano totalmente non coinvolti nella regolazione delle pulsioni, in cui invece sembra avere ancora un ruolo inibitorio il sottotipo recettoriale 5-HT_{1A} [54].

I recettori 5-HT_{2B} furono inizialmente identificati nel fondo dello stomaco. In ogni caso, le conoscenze relative a tale sottotipo recettoriale sono alquanto limitate.

I sottotipi recettoriali 5-HT_{2C} si trovano soprattutto nel SNC e sono localizzati, in massima parte, nelle cellule epiteliali del plesso corioideo, che è il sito primario della produzione di liquido cerebrospinale. Si ipotizza, infatti, che i recettori 5-HT_{2C} siano capaci di regolare la composizione ed il volume del fluido cerebrospinale. Il recettore 5-HT_{2C} è stato, inoltre, implicato nel controllo dei comportamenti alimentari e nella propensione a sviluppare stati ansiogeni [55,56]. L'attivazione di questo sottotipo recettoriale causa infatti una drastica riduzione dell'appetito e dello stimolo della fame, come dimostrato recentemente da uno studio condotto su un modello murino [57]. Agonisti recettoriali come la *m*-clorofenilpiperazina (mCPP) o la lorcaserina causano infatti ipofagia e riescono a controllare la corretta omeostasi del glucosio e di conseguenza il corretto bilancio energetico dell'organismo, per azione diretta sul sottotipo recettoriale 5-HT_{2C} [58,59]. Tuttavia, tali dati clinici sono ancora preliminari e la mancanza di agonisti ed antagonisti altamente specifici per questo recettore, limita fortemente le conoscenze sul ruolo funzionale del recettore stesso. L'attivazione dei recettori 5-HT_{2A} potrebbe inoltre essere mediata dalla stimolazione dei 5-HT_{2C}, a causa delle somiglianze strutturali tra i due recettori [3]. Gli antagonisti di questo sottotipo recettoriale, come la metisergide, sono usati nel trattamento delle cefalee di origine vascolare e recentemente sono stati proposti come potenziali ansiolitici: topi 5-HT_{2C}-*knock out* mostrano infatti un fenotipo ansiolitico, evidenza che conferma il ruolo ansiogeno di questo recettore [60].

Recettori 5-HT₃

Il recettore 5-HT₃ si differenzia dagli altri sottotipi recettoriali in quanto è l'unico esempio di recettore per un trasmettitore monoaminico che funzioni come canale ionico attivato da un ligando [3]. Questi recettori sono localizzati sulle terminazioni parasimpatiche nel tratto gastrointestinale, nelle afferenze vagali e splancniche, mentre, a livello del SNC, si trovano prevalentemente nel nucleo del tratto solitario e nell'area postrema. I recettori 5-HT₃, presenti sia nel canale gastroenterico che nel SNC, sono coinvolti nella risposta emetica: antagonisti recettoriali (ondansetron, tropisetron, granisetron) sono utilizzati come antiemetici nella terapia adiuvante antitumorale o antidiarroici in alcune forme di sindrome dell'intestino irritabile [50,61].

Recettori 5-HT₄

I recettori 5-HT₄ sono accoppiati alla proteina G_s per attivare l'adenilato ciclasi, producendo così un aumento dei livelli intracellulare di AMP ciclico. Essi sono ampiamente diffusi in tutto il corpo. In particolare, a livello del SNC si ritrovano nei neuroni dei collicoli superiore e inferiore e nell'ippocampo, mentre nel canale gastroenterico sono localizzati nei neuroni del plesso mesenterico, sui muscoli lisci e sulle cellule secretorie. Si pensa che nel canale digerente il recettore 5-HT₄, unitamente al sottotipo recettoriale 5-HT_{2A}, sia in grado di evocare la secrezione e facilitare il riflesso peristaltico. Agonisti di tali recettori potrebbero essere utilizzati per il trattamento di disturbi gastrointestinali [3], quali ad esempio le forme moderate o gravi di costipazione cronica. Infatti, i farmaci attualmente disponibili per il trattamento della stipsi sono i lassativi osmotici (lattulosio, idrossido di magnesio e glicole polietilenico), che richiedono però una massiccia assunzione d'acqua da parte del paziente ed un continuo controllo dei

livelli degli elettroliti nel plasma [62]. Alla luce di ciò, un nuovo approccio farmacologico prevede l'utilizzo di agonisti 5-HT₄, già commercialmente disponibili, come il tegaserod o la prucalopride, per il trattamento dei disturbi da costipazione cronica: il primo è un agonista parziale utilizzato solamente nelle forme gravi di costipazione, in quanto può causare in rari casi eventi ischemici cardiaci; il secondo invece, dotato di un'elevata affinità e selettività nei confronti del sottotipo recettoriale 5-HT₄ risulta molto più maneggevole e sicuro e rappresenta un valido approccio per il trattamento delle forme croniche di stipsi[63]. Entrambi i farmaci, tuttavia, attivano i neuroni del plesso mioenterico che promuovono la contrazione della muscolatura e la peristalsi intestinale [64].

Infine, come evidenziato in un recente studio anche il sottotipo recettoriale 5-HT₄ risulta coinvolto nella proliferazione di alcuni tumori [40]. In particolare, i recettori 5-HT₄, unitamente ai sottotipi recettoriali 5-HT₁ e 5-HT₂, sono stati identificati nelle linee cellulari del carcinoma prostatico e la loro stimolazione è correlata ad una attività di promozione della crescita e possono essere funzionalmente correlati agli oncogeni [65].

Relativamente alle altre classi di recettori serotoninergici, 5-HT₅, 5-HT₆ e 5-HT₇, i dati a nostra disposizione, insieme anche all'assenza di ligandi selettivi, non sono attualmente sufficienti a definirne le funzioni e i meccanismi di trasduzione del segnale.

IMPOSTAZIONE DELLA RICERCA

In considerazione del coinvolgimento della serotonina in numerosi processi fisiologici e fisiopatologici ed alla luce delle innumerevoli potenzialità terapeutiche derivanti da molecole in grado di interagire con i recettori serotoninergici, durante la mia attività di dottorato ho focalizzato la mia attenzione sulla sintesi di nuovi ligandi per i recettori serotoninergici 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2C}. Le funzioni di tali recettori sono quelle maggiormente studiate tra le varie sottoclassi ed è noto il coinvolgimento di questi sottotipi recettoriali soprattutto in patologie a carico del SNC. In letteratura, sono stati già riportati molteplici composti (agonisti, agonisti parziali e antagonisti dei sottotipi recettoriali 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C}) appartenenti a diverse classi chimiche che si sono dimostrati utili nella terapia dell'ansia [66-67], della depressione [68-69], della nausea e del vomito [70-71], dell'Alzheimer [72], del cancro della prostata [40,65], dell'ipertensione [73-74] e dell'alcolismo [75]. Tuttavia, la maggiore limitazione al potenziale utilizzo terapeutico delle molecole già sintetizzate e presenti in letteratura risiede nella loro indesiderata affinità verso altri tipi recettoriali, quali i dopaminergici D₁ e D₂ e gli adrenergici α_1 e α_2 , che presentano un'elevata omologia strutturale con i recettori serotoninergici. Attualmente infatti, sono relativamente pochi i farmaci selettivi per i sottotipi recettoriali serotoninergici (Tabella 2) ed alcuni di questi presentano un profilo farmacologico non completamente elucidato.

Il gruppo di ricerca con il quale ho svolto il mio lavoro di dottorato è impegnato da diversi anni in un filone di ricerca che ha come obiettivo principale la progettazione e la sintesi di nuove molecole dotate non solo di affinità, ma anche di selettività, nei confronti dei sottotipi recettoriali serotoninergici 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C}.

Tabella 2. Principali sostanze farmaceutiche attive sul sistema serotoninergico.

Sostanza farmaceutica	Principale indicazione clinica	Meccanismo d'azione
Buspirone	Ansiolitico	Agonista parziale 5-HT _{1A} / antagonista D ₂
Vilazodone	Antidepressivo	Agonista parziale 5-HT _{1A}
Alizapride Bromapride Cisapride Prucalopride Tegaserod	Disturbi motilità Gastrointestinale	Agonista 5-HT ₄
Mianserina	Antidepressivo	Antagonista non selettivo
Almotriptan Naratriptan Rizatriptan Sumatriptan Zolmitriptan	Anti emicrania	Agonisti 5-HT _{1D}
Metisergide	Anti emicrania	Antagonista 5-HT _{2C}
Ketanserina	Anti-ipertensivo	Antagonista 5-HT _{2A} α_1 -adrenergico
Dolasetron Granisetron Ondansetron Tropisetron	Antiemetico	Antagonista 5-HT ₃
Fenfluramina	Terapia obesità	Agonista indiretto
Reserpina	Anti-ipertensivo neurolettico	Inibizione accumulo vescicolare (non specifico per 5-HT)
Citalopram Fluvoxetina Paroxetina Sertalina	Antidepressivi	Inibitori selettivi della ricaptazione (SSRI)
Amitriptilina Clomipramina Imipramina Venlafaxina Desvenlafaxina	Antidepressivo	Inibitori della ricaptazione non selettivi (SNRI)
Fenelzina Isocarbossazide Nialamide	Antidepressivi	Inibitori MAO non selettivi
Moclobemide Tolaxatone	Antidepressivi	Inibitori MAO A

Sono state, infatti, sintetizzate diverse serie di composti, a nucleo benzotriazolico [76], benzoiltriazolico [77], benzotriazinonico [78-79], idrossibenzotriazinonico, saccarinico [80-81], N-idrossinorbornenico [82], indolico [83] e N'-cianoisonicotinamidinico [84].

Tutti i composti sintetizzati sono caratterizzati dalla presenza di uno *scaffold* piperazinico 4-X-sostituito, legato attraverso una catena alchilica di lunghezza variabile (n) ad un nucleo eterociclico (R) (Figura 4). Tutti questi elementi, così come confermato dai dati presenti in letteratura [76-84], modulano sia l'affinità che la selettività nei confronti dei recettori serotoninergici presi in esame.

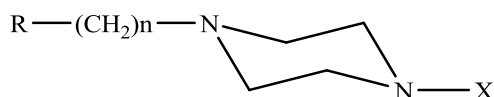


Figura 4. Struttura generale dei derivati arilpiperazinici

Nell'ambito dell'ultima serie di composti sintetizzati, a nucleo N'-cianoisonicotinamidinico, sono stati individuati numerosi derivati con interessanti profili di affinità e selettività per il sottotipo recettoriale 5-HT_{1A} [84]. Tali ligandi sono caratterizzati dalla presenza di una catena alchilica propilenica (che nelle precedenti serie di derivati aveva fornito i migliori risultati di affinità e selettività) e dalla presenza di residui arilici variamente sostituiti supportati sull'anello piperazinico. L'analisi dei risultati dei saggi di *binding* ha permesso di evidenziare l'elevata affinità e selettività di queste molecole verso il sottotipo recettoriale 5-HT_{1A}, indipendentemente da quale sia il sostituito sull'anello arilpiperazinico. Tale evidenza, estremamente interessante nello studio dei ligandi serotoninergici, ha permesso di tracciare delle preliminari considerazioni sulle relazioni struttura-affinità dei composti sintetizzati. Infatti, nelle precedenti serie di composti

ottenuti dal gruppo di ricerca presso cui ho svolto la mia attività di dottorato [76-83], il sostituente legato al residuo arilico dello *scaffold* piperazinico risultava determinante nel conferire affinità e selettività verso un determinato sottotipo recettoriale. Dall'analisi retrospettiva dei risultati ottenuti e dagli studi di *molecular modeling*, è stato possibile evidenziare che generalmente un sostituente poco ingombrato (-OCH₃) in posizione *orto* sull'anello fenilpiperazinico conferiva una marcata affinità e selettività nei confronti del sottotipo recettoriale 5-HT_{1A}, mentre la presenza di un sostituente fortemente ingombrato (un residuo naftilico) o la presenza di un sostituente in posizione *para* dell'anello arilpiperazinico determinava un profilo di affinità e selettività spostato verso il sottotipo recettoriale 5-HT_{2A}. Nella serie di derivati a nucleo N'-cianoisonicotinamidinico, tali considerazioni sono risultate confermate relativamente al profilo di affinità/selettività mostrato da tali derivati verso il sottotipo recettoriale 5-HT_{1A}, ma nessuna molecola si è dimostrata affine e selettiva verso il sottotipo 5-HT_{2A}. L'attenzione si è quindi spostata all'analisi delle peculiarità del nuovo *scaffold* N'-cianoisonicotinamidinico ed, in particolare, al fine di valutare se una diversa posizione dell'azoto piridinico possa da sola influenzare l'affinità e la selettività nei confronti dei vari sottotipi è stata progettata e sintetizzata una serie omologa di derivati a nucleo N'-cianopicolinamidinico (Figura 5).

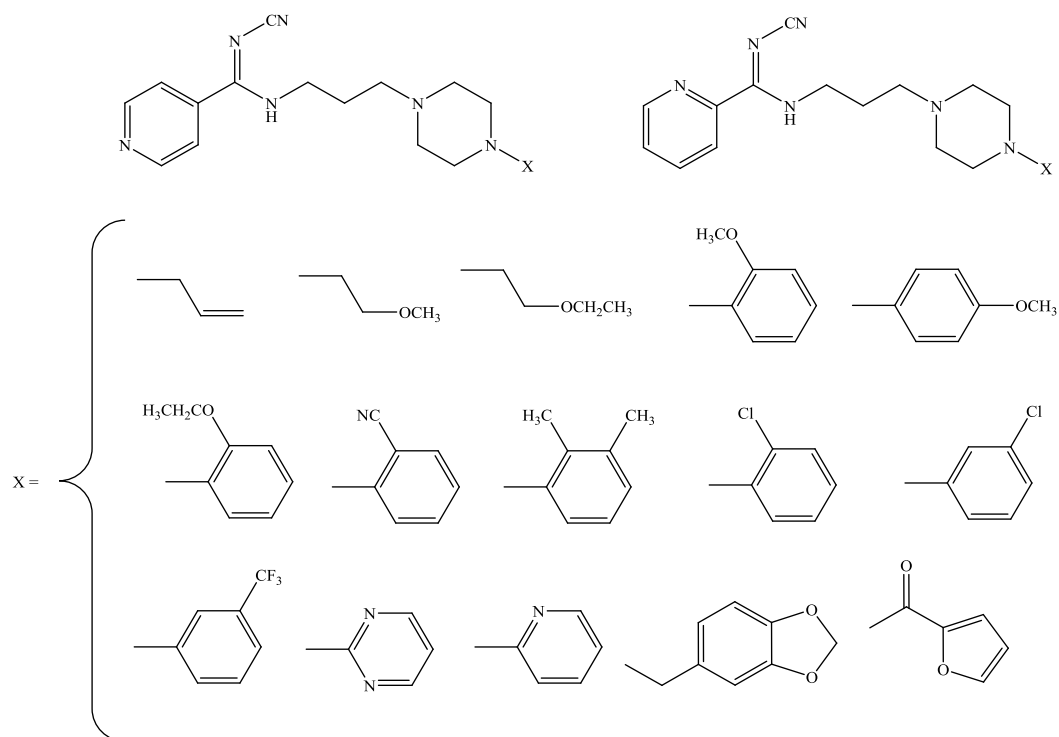


Figura 5. Derivati N'-cianoisonicotinamidinici ed N'-cianopicolinamidinici

Inoltre, al fine di ampliare ulteriormente gli studi di relazione struttura-attività e di indagare l'importanza della funzione N'-cianoamidinica, sono state progettate e sintetizzate due nuove serie di derivati a nucleo isonicotinico e picolinico. Tali nuclei rappresentano, infatti, una semplificazione molecolare dei corrispondenti nuclei N'-cianoisonicotinamidinico ed N'-cianopicolinamidinico. Idonee procedure di sintesi, purificazione e caratterizzazione hanno portato all'ottenimento dei derivati oggetto del progetto di ricerca (Figure 6 e 7).

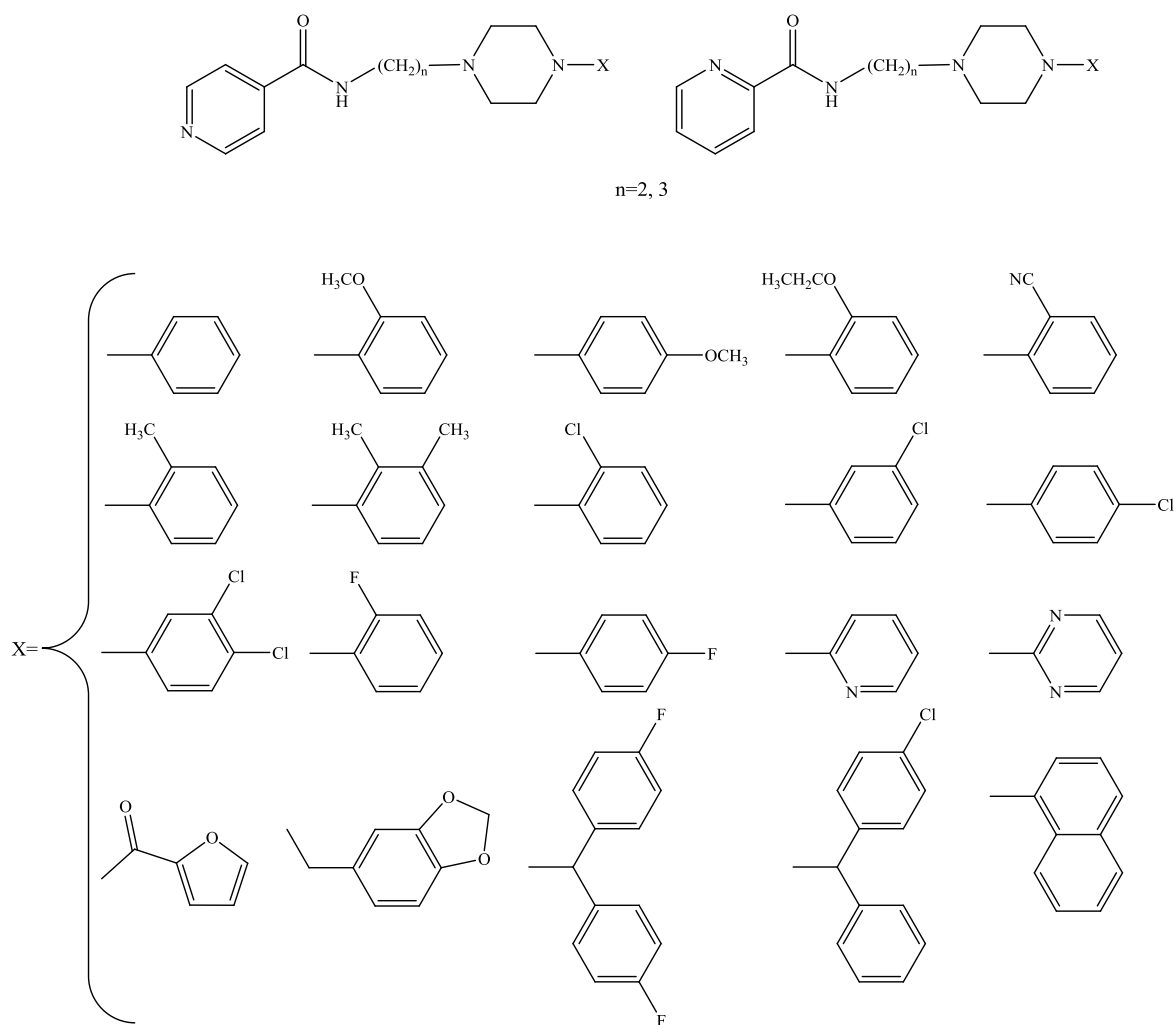


Figura 6. Derivati a nucleo isonicotinico e picolinico

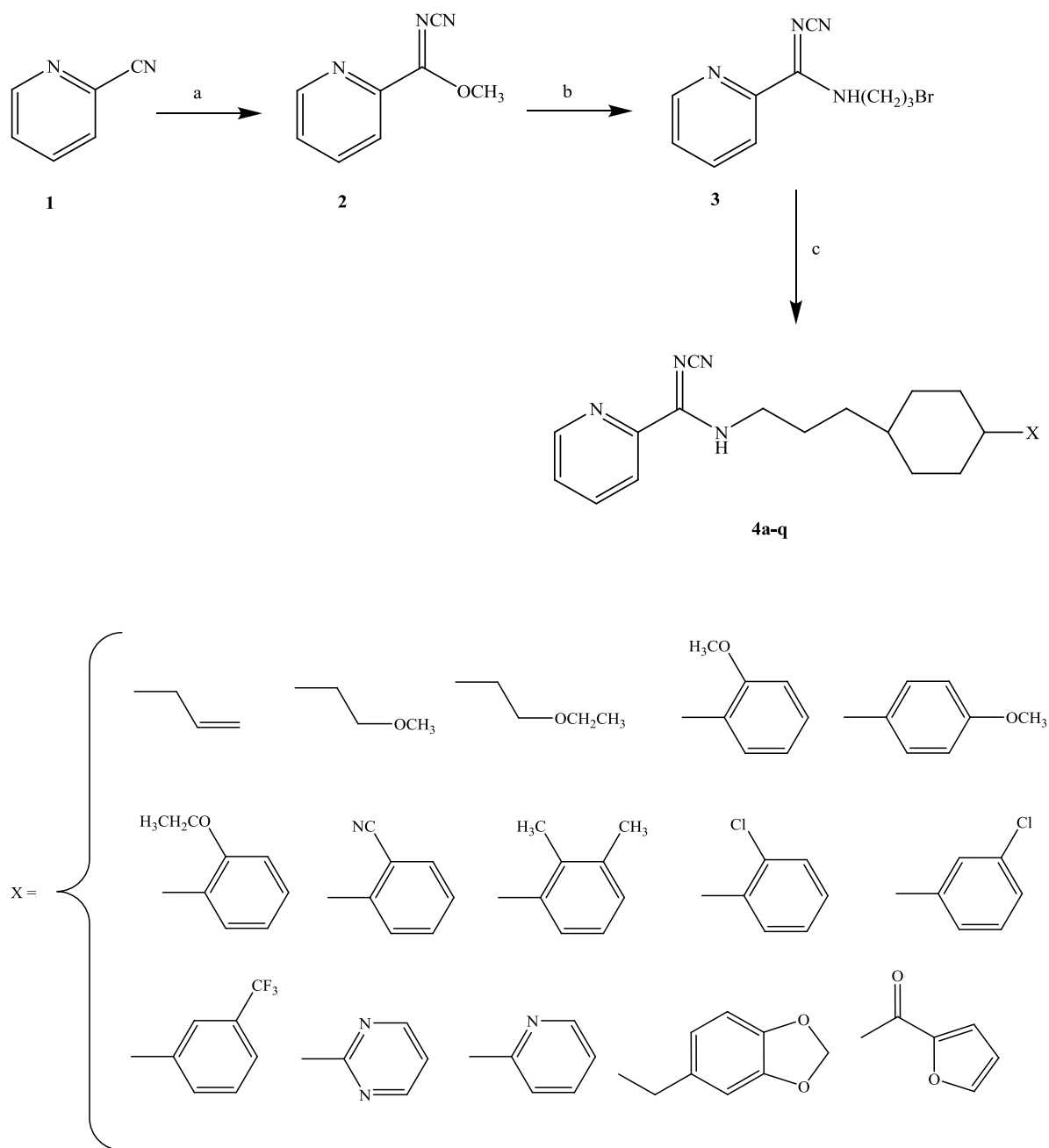
Tutti i composti sintetizzati sono stati sottoposti a saggi di *binding* con specifici radioligandi al fine di valutarne l'affinità e la selettività verso i sottotipi recettoriali 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C}. Inoltre, sono stati selezionati i composti di ogni serie risultati più affini e selettivi, e sono stati sottoposti a ulteriori saggi di *binding* sui recettori dopaminergici D₁ e D₂ ed adrenergici α_1 e α_2 . Infine, i composti caratterizzati da un più interessante profilo di affinità/selettività sono stati successivamente valutati in saggi funzionali, al fine di definirne il profilo di agonista/antagonista recettoriale.

PARTE SPERIMENTALE

SOMMARIO DELLE OPERAZIONI

Sintesi dei derivati a nucleo N'-cianopicolinamidinico

La preparazione dei derivati a nucleo N'-cianopicolinamidico (**4a-q**) è stata effettuata seguendo le tappe illustrate nello **Schema 1** [85]. Il nucleo di partenza, la 2-cianopiridina **1** viene trattata con CH₃ONa in metanolo anidro a temperatura ambiente *overnight*. Viene quindi aggiunto acido acetico per neutralizzare l'ambiente di reazione ed il prodotto grezzo viene evaporato *in vacuo*. L'aggiunta di dietiletere porta alla formazione di un precipitato bianco che viene allontanato mediante filtrazione. Il filtrato viene evaporato, ottenendo il corrispondente metil-2-piridincarbossimmidato grezzo, sottoforma di un olio bruno che, senza subire ulteriori purificazioni, viene aggiunto ad una miscela di NH₂CN in tampone fosfato (pH 5.4) per fornire il corrispondente metil-N'-ciano-2-piridincarbossimmidato (**2**). Tale intermedio viene quindi fatto reagire con la 3-bromopropilammina bromidrata in MeOH anidro, in presenza di TEA per 24h a temperatura ambiente per fornire la N-(3-bromopropil)-N'-cianopicolinamidina (**3**). Il nucleo così ottenuto è stato successivamente condensato con le opportune piperazine 4-sostituite, in presenza di NaI e K₂CO₃ in acetonitrile a 80°C a refluxo per 24 ore fornendo i composti finali **4a-q**, che sono stati successivamente purificati mediante cromatografia su colonna di gel di silice, cristallizzati da etere/etanolo e caratterizzati mediante ¹H-NMR, ¹³C-NMR e ESI-MS con rese comprese tra 14-63% (Schema 1).



Schema 1. Reagenti e condizioni: (a) CH_3ONa , H_2NCN , CH_3OH anidro, 8h; (b) $\text{Br}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2 \cdot \text{HBr}$, TEA, CH_3OH anidro, 24h; (c) Piperazina 4-X-sostituita, K_2CO_3 , NaI, CH_3CN , 80°C , 24h.

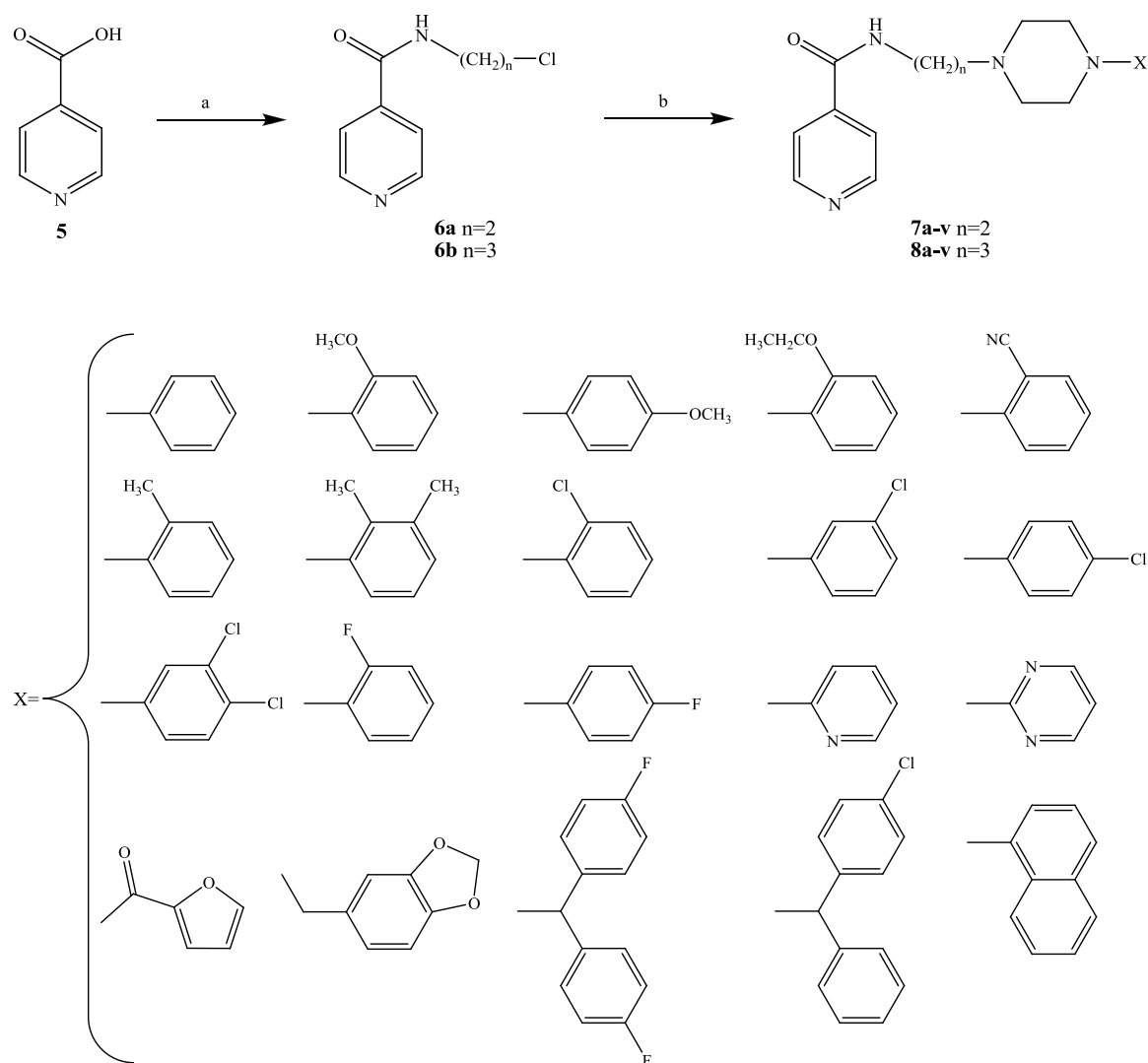
Sintesi dei derivati a nucleo isonicotinico

La strategia sintetica utilizzata per la preparazione dei derivati isonicotinamidici (**7a-v** e **8a-v**) è riportata nello **Schema 2**. Il primo stadio consiste nella condensazione dell'acido isonicotinico **5** con l'opportuna 2-cloroetilammina cloridrata o 3-cloropropilammina cloridrata in presenza di DCC, HOBt e TEA in acetonitrile a temperatura ambiente, per 24 ore per fornire le corrispondenti cloroalchilisonicotinammidi **6a** e **6b**. Tali intermedi sono stati successivamente condensati con le opportune piperazine 4-sostituite, in presenza di un eccesso del 10% di NaI e di K₂CO₃ in acetonitrile a 80°C a refluxo per 24 ore, fornendo i composti finali **7a-v** e **8a-v**. Tutti i composti sintetizzati sono stati purificati mediante colonna cromatografica su gel di silice, cristallizzati da etere/esano e caratterizzati mediante ¹H-NMR, ¹³C-NMR e ESI-MS con rese comprese tra 7-89% (Schema 2).

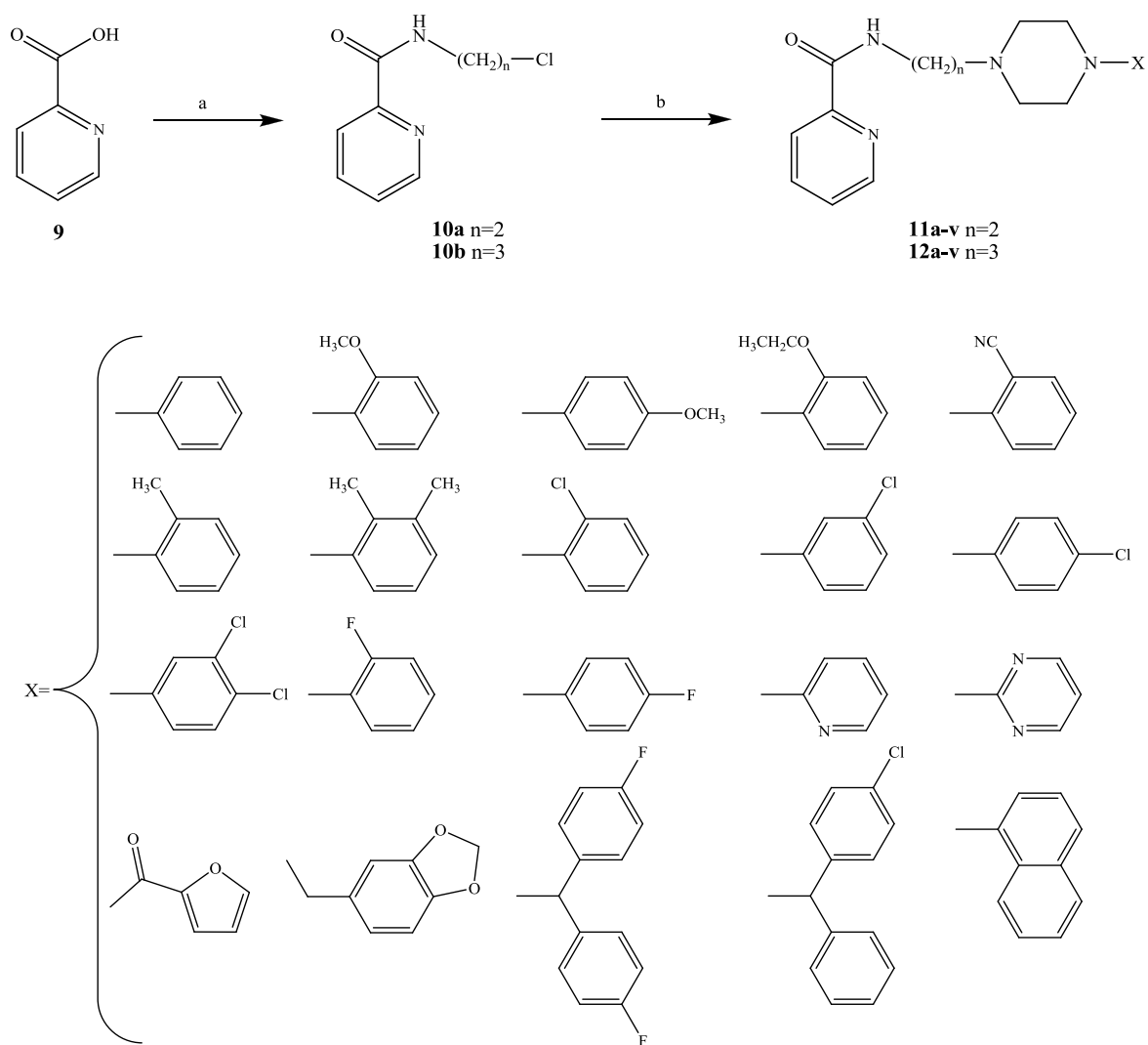
Sintesi dei derivati a nucleo picolinico

La strategia sintetica utilizzata per la preparazione dei composti a nucleo picolinico, riportata nello **Schema 3**, risulta analoga a quella utilizzata per l'ottenimento dei derivati a nucleo isonicotinico. Si procede dapprima alla condensazione dell'acido picolinico **9** con l'opportuna 2-cloroetilammina cloridrata o 3-cloropropilammina cloridrata, utilizzando come reattivi attivanti della funzione carbossilica DCC e HOBt in presenza di TEA in acetonitrile a temperatura ambiente, per 24 ore, ottenendo le corrispondenti cloroalchilpicolinammidi **10a** e **10b**. Successivamente, tali intermedi sono stati condensati con le opportune arilpiperazine, in presenza di un eccesso del 10% di NaI e di K₂CO₃ in acetonitrile a 80°C a refluxo per 24 ore, per fornire i composti finali **11a-v** e **12a-v**. Tutti i composti sintetizzati sono stati purificati mediante colonna cromatografica su gel di silice,

cristallizzati da etere/esano e caratterizzati mediante $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ e ESI-MS con rese comprese tra 10-86%(Schema 3).



Schema 2. Reagenti e condizioni: (a) $\text{Cl}(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2 \cdot \text{HCl}$, DCC, HOBT, TEA, CH_3CN , 24h; (b) Piperazina 4-X-sostituita, K_2CO_3 , NaI, CH_3CN , 80°C , 24h.



Schema 3. Reagenti e condizioni: (a) $\text{Cl}(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2 \cdot \text{HCl}$, DCC, HOBT, TEA, CH_3CN , 24h; (b) Piperazina 4-X-sostituita, K_2CO_3 , NaI, CH_3CN , 80°C , 24h.

PROCEDURE SPERIMENTALI DELLE SINTESI

DERIVATI A NUCLEO N'-CIANOPICOLINAMIDINICO

Sintesi del metil-N'-ciano-2-piridincarbossimmidato (Schema 1: composto 2)

Una miscela di 2-cianopiridina (**1**) (5.00 g, 0.048 mol) e sodio metossido (0.130 g, 0.0024 mol) in metanolo anidro (50 mL) è lasciata sotto agitazione e.m. a temperatura ambiente per 12h. Successivamente viene aggiunto acido acetico (0.159 g, 0.0026 mol) al fine di neutralizzare la soluzione che viene poi evaporata sotto vuoto. Al residuo così ottenuto, viene aggiunto dietiletere (50 mL), portando alla formazione di un precipitato che viene allontanato per filtrazione. Dal filtrato, dopo allontanamento del solvente per evaporazione sotto vuoto, si ottiene il corrispondente metil-2-piridincarbossimmidato grezzo (3.46 g; 0.025 mol) sottoforma di un olio bruno. L'intermedio, senza essere ulteriormente purificato viene immediatamente aggiunto ad una miscela di NH_2CN (2.10 g, 0.050 mol) in tampone fosfato (32.14 g di $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 7.30 g di Na_2HPO_4 , 55 mL di H_2O) a pH 5.4. La miscela così ottenuta è lasciata per 4 ore a temperatura ambiente sotto vigorosa agitazione e.m.. Successivamente la soluzione viene estratta mediante imbuto separatore, utilizzando come fase organica diclorometano. Le fasi organiche riunite sono state anidificate con Na_2SO_4 anidro, filtrate ed evaporate sotto vuoto per fornire il corrispondente metil-N'-ciano-2-piridincarbossimmidato grezzo (**2**) (4.16 g), che viene utilizzato direttamente nella reazione successiva.

Sintesi dell'N-(3-bromopropil)-N'-cianopicolinamidina (Schema 1: composto 3)

Ad una soluzione di metil-N'-ciano-2-piridincarbossimmidato (**2**) (5.00 g, 0.031 mol) in metanolo anidro (50 mL) viene successivamente aggiunta la 3-bromopropilammina

bromidrata (7.37 g, 0.034 mol) e la trietilammina (3.44 g, 0.034 mol). La miscela di reazione è lasciata sotto agitazione e.m. per 4 ore a temperatura ambiente. Successivamente, dopo aver allontanato il solvente per evaporazione sotto vuoto, il residuo viene ripreso con acqua ed estratto in imbuto separatore con acetato di etile. La fase organica separata, anidrificata con Na₂SO₄ anidro, filtrata ed evaporata sotto vuoto fornisce un residuo che viene purificato mediante cromatografia su colonna di gel di silice, utilizzando come eluente una miscela dietilere/etanolo (9:1 v/v). Il prodotto isolato è cristallizzato da dietilere/esano, fornendo il prodotto desiderato (**3**) sottoforma di solido bruno (5.25 g, resa del 63%; p.f. 73-74°C).

Procedura generale per la preparazione dei derivati a nucleo N'-cianopicolinamidinico (Schema 1: 4a-q)

Una miscela di N-(3-bromopropil)-N'-cianopicolinamidina (**3**) (1.0 g, 0.0037 mol) e ioduro di sodio (0.617 g, 0.0041 mol) in acetonitrile viene posta a ricadere, sotto agitazione e.m., per 30 minuti. Successivamente viene aggiunta l'opportuna piperazina 4-X-sostituita (0.0037 mol) e carbonato di potassio (0.567 g, 0.0041 mol). La miscela di reazione così ottenuta viene lasciata a ricadere sotto agitazione e.m. per 24 ore (tempo variabile in funzione della piperazina utilizzata). Si procede, quindi, alla filtrazione mediante filtro Gooch per allontanare il K₂CO₃; dal filtrato si allontana il solvente per evaporazione sotto vuoto ed il residuo ottenuto viene ripreso con acqua ed estratto per tre volte in imbuto separatore utilizzando come fase organica diclorometano. La fase organica, anidrificata con Na₂SO₄ anidro, filtrata ed evaporata sotto vuoto, fornisce un residuo grezzo che viene purificato mediante cromatografia su colonna aperta, utilizzando come fase stazionaria gel di silice e come eluente miscele di diversi solventi (diclorometano/metanolo o dietilere/metanolo in diversi rapporti in funzione della piperazina utilizzata). I composti

così isolati, vengono cristallizzati da dietiletere/etanolo oppure dietiletere/esano fornendo i prodotti finali **4a-q**. L'analisi degli spettri NMR delle molecole sintetizzate è consistente con le strutture considerate. In Tabella 3 sono riportate le rese percentuali e i punti di fusione di ciascun prodotto sintetizzato.

Tabella 3. Proprietà chimico-fisiche dei derivati N'-cianopicolinamidinici (**4a-q**).

Composto	X	Formula	P.M.	p.f. (°C)	Resa (%)
4a		C ₁₇ H ₂₄ N ₆	312.41	93-94	32
4b		C ₁₇ H ₂₆ N ₆ O	330.43	60-61	16
4c		C ₁₈ H ₂₈ N ₆ O	344.48	195-197	56
4d		C ₂₁ H ₂₆ N ₆ O	378.47	113-116	20
4e		C ₂₁ H ₂₆ N ₆ O	378.47	106-108	15
4f		C ₂₂ H ₂₈ N ₆ O	392.50	122-125	14
4g		C ₂₁ H ₂₃ N ₇	373.45	118-120	20
4h		C ₂₂ H ₂₈ N ₆	376.50	119-120	15
4i		C ₂₀ H ₂₃ ClN ₆	382.89	86-88	26
4l		C ₂₀ H ₂₃ ClN ₆	382.89	148-149	30
4m		C ₂₁ H ₂₃ F ₃ N ₆	416.44	115-116	24
4n		C ₁₈ H ₂₂ N ₈	350.42	110-111	27
4o		C ₁₉ H ₂₃ N ₇	349.43	90-92	16
4p		C ₂₂ H ₂₆ N ₆ O ₂	406.48	104-105	63
4q		C ₁₉ H ₂₂ N ₆ O ₂	366.42	102-104	29

DERIVATI A NUCLEO ISONICOTINICO

Sintesi delle cloroalchilisonicotinammidi (Schema 2: composti **6a** e **6b**)

Ad una miscela di acido isonicotinico **5** (5.00 g, 0.041 mol) sciolto in acetonitrile (50mL) vengono aggiunti dicicloesilcarbodiimmide (DCC, 9.28 g, 0.045 mol) ed idrossibenzotriazolo (HOBt, 6.08 g, 0.045 mol) al fine di attivare la funzione carbossilica e la miscela di reazione viene tenuta sotto agitazione elettromagnetica a 0°C per un'ora. Successivamente viene aggiunta trietilammina (TEA, 4.55 g, 0.045 mol) e l'opportuna 2-cloroetilammina cloridrata (4.75g, 0.041 mol) o la 3-cloropropilammina cloridrata (5.33 g, 0.041 mol) e la miscela di reazione, così ottenuta, viene tenuta sotto agitazione e.m. a temperatura ambiente per 24 h. La soluzione viene quindi raffreddata a 0°C per un'ora al fine di permettere la precipitazione selettiva della dicicloesilurea (DCU) formatasi, che viene quindi filtrata. Il filtrato viene evaporato sotto vuoto e successivamente sottoposto ad estrazione in imbuto separatore, utilizzando come fase organica diclorometano e come fase acquosa soluzioni di NaHCO₃, H₂O distillata ed H₂O satura di NaCl. La fase organica viene anidrificata mediante Na₂SO₄ anidro, filtrata ed evaporata sotto vuoto ed i prodotti grezzi ottenuti vengono purificati mediante cromatografia su colonna aperta, utilizzando come fase stazionaria gel di silice e come eluente una miscela di diclorometano/metanolo (9:1 v/v). La successiva cristallizzazione da dietilere fornisce gli intermedi **6a** e **6b** (rispettivamente 6.71 g di **6a**, resa 89%; 6.84 g di **6b**, resa 84%).

Procedura generale per la preparazione dei derivati a nucleo isonicotinico (Schema 2: **7a-v** e **8a-v**)

Una miscela dell'opportuna N-(2-cloroetil)isonicotinammide **6a** (0.500 g, 2.71 mmol) o di N-(3-cloropropil)isonicotinammide **6b** (0.500 g, 2.52 mmol) e NaI (in eccesso

del 10%) in acetonitrile (30 mL) viene posta sotto agitazione e.m. a riflusso per 30 minuti. Successivamente, viene aggiunto K_2CO_3 (in eccesso del 10%) e l'opportuna piperazina 4-X-sostituita (in quantità equimolare con l'opportuna cloroalchilisonicotinammide). La miscela di reazione così ottenuta viene tenuta sotto agitazione e.m. a ricadere per 24 ore. Dopo raffreddamento a temperatura ambiente, la soluzione viene filtrata per allontanare il K_2CO_3 e portata a secco allontanando il solvente mediante evaporazione sotto vuoto. Il residuo ottenuto viene ripreso con acqua distillata ed estratto per tre volte, in imbuto separatore, utilizzando diclorometano come fase organica. Le fasi organiche riunite vengono anidrificate con Na_2SO_4 anidro, filtrate ed evaporate sotto vuoto ed i prodotti grezzi così ottenuti vengono purificati mediante cromatografia su colonna, utilizzando come fase stazionaria gel di silice e come eluente una miscela di diclorometano/metanolo in diversi rapporti (9,5:0,5 v/v; 9:1 v/v). La successiva cristallizzazione da dietiletere fornisce i prodotti finali **7a-s** e **8a-s**, con rese comprese tra 7-89%. I prodotti finali **7t-v** e **8t-v** invece sono stati dapprima trasformati nei corrispondenti sali cloridrati e successivamente cristallizzati da etanolo/etere dietilico. L'analisi degli spettri NMR delle molecole sintetizzate è consistente con le strutture proposte. Le rese percentuali ed i punti di fusione di ciascun prodotto sintetizzato sono riportate in Tabella 4 ed in Tabella 5.

Tabella 4. Proprietà chimico-fisiche dei derivati a nucleo isonicotinico (**7a-v**).

Comp.	X	Formula	P.M.	p.f. (°C)	Resa (%)
7a		C ₁₈ H ₂₂ N ₄ O	310.39	151-153	8
7b		C ₁₉ H ₂₄ N ₄ O ₂	340.42	122-124	32
7c		C ₁₉ H ₂₄ N ₄ O ₂	340.42	146-147	37
7d		C ₂₀ H ₂₆ N ₄ O ₂	354.45	58-60	10
7e		C ₁₉ H ₂₁ N ₅ O	335.40	89-91	11
7f		C ₁₉ H ₂₄ N ₄ O	324.42	100-102	10
7g		C ₂₀ H ₂₆ N ₄ O	338.45	151-153	26
7h		C ₁₈ H ₂₁ ClN ₄ O	344.84	114-116	13
7i		C ₁₈ H ₂₁ ClN ₄ O	344.84	138-139	35
7l		C ₁₈ H ₂₁ ClN ₄ O	344.84	114-116	32
7m		C ₁₈ H ₂₀ Cl ₂ N ₄ O	379.28	125-128	7
7n		C ₁₈ H ₂₁ FN ₄ O	328.38	144-146	15
7o		C ₁₈ H ₂₁ FN ₄ O	328.38	87-88	13
7p		C ₁₇ H ₂₁ N ₅ O	311.38	145-146	34

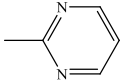
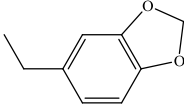
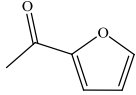
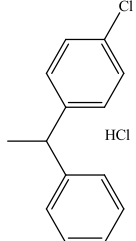
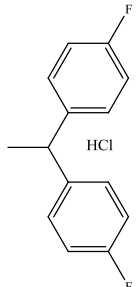
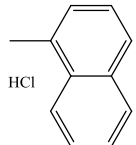
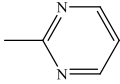
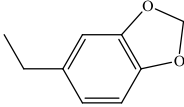
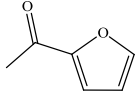
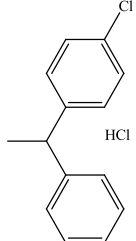
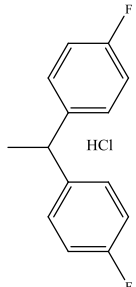
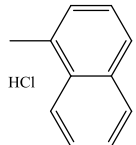
7q		$C_{16}H_{20}N_6O$	312.37	145-146	14
7r		$C_{20}H_{24}N_4O_3$	368.43	108-111	12
7s		$C_{17}H_{20}N_4O_3$	328.37	112-114	11
7t		$C_{25}H_{28}Cl_2N_4O$	471.42	203-205	13
7u		$C_{25}H_{27}ClF_2N_4O$	472.96	80-82	14
7v		$C_{22}H_{25}ClN_4O$	396.91	164-165	21

Tabella 5. Proprietà chimico-fisiche dei derivati a nucleo isonicotinico (**8a-v**).

Comp.	X	Formula	P.M.	p.f. (°C)	Resa (%)
8a		C ₁₉ H ₂₄ N ₄ O	324.42	126-127	35
8b		C ₂₀ H ₂₆ N ₄ O ₂	354.45	74-75	28
8c		C ₂₀ H ₂₆ N ₄ O ₂	354.45	117-119	47
8d		C ₂₁ H ₂₈ N ₄ O ₂	368.47	51-52	25
8e		C ₂₀ H ₂₃ N ₅ O	349.43	79-81	51
8f		C ₂₀ H ₂₆ N ₄ O	338.45	52-53	34
8g		C ₂₁ H ₂₈ N ₄ O	352.47	106-107	36
8h		C ₁₉ H ₂₃ ClN ₄ O	358.87	54-56	45
8i		C ₁₉ H ₂₃ ClN ₄ O	358.87	89-90	28
8l		C ₁₉ H ₂₃ ClN ₄ O	358.87	152-153	34
8m		C ₁₉ H ₂₂ Cl ₂ N ₄ O	393.31	105-108	38
8n		C ₁₉ H ₂₃ FN ₄ O	342.41	49-51	36
8o		C ₁₉ H ₂₃ FN ₄ O	342.41	131-132	44
8p		C ₁₈ H ₂₃ N ₅ O	325.41	45-46	88

8q		$C_{17}H_{22}N_6O$	326.40	99-100	46
8r		$C_{21}H_{26}N_4O_3$	382.46	100-101	89
8s		$C_{18}H_{22}N_4O_3$	342.39	118-119	65
8t		$C_{26}H_{30}Cl_2N_4O$	485.45	169-171	30
8u		$C_{26}H_{29}ClF_2N_4O$	486.98	177-179	18
8v		$C_{23}H_{27}ClN_4O$	410.94	64-67	59

DERIVATI A NUCLEO PICOLINICO

Sintesi delle cloroalchilpicolinammidi (Schema 3: composti **10a** e **10b**)

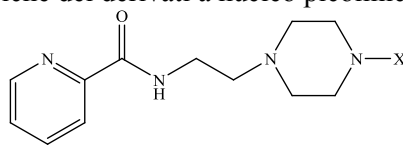
Una miscela costituita da acido picolinico **9** (5.00 g, 0.041 mol), dicicloesilcarbodiimmide (DCC, 9.28 g, 0.045 mol) ed idrossibenzotriazolo (HOBt, 6.08 g, 0.045 mol) in acetonitrile (50mL) viene tenuta sotto agitazione elettromagnetica a 0°C per un'ora. Viene quindi aggiunta trietilammina (TEA, 4.55 g, 0.045 mol) e l'opportuna 2-cloroetilammina cloridrata (4.75g, 0.041 mol) o 3-cloropropilammina cloridrata (5.33 g, 0.041 mol) e la miscela di reazione così ottenuta viene posta sotto agitazione e.m. a temperatura ambiente per 24 h. La soluzione viene quindi raffreddata a 0°C per un'ora al fine di permettere la precipitazione selettiva della dicicloesilurea (DCU) formatasi, che viene quindi allontanata mediante filtrazione con filtro Gooch. Il filtrato viene essiccato sotto vuoto e successivamente sottoposto ad estrazione in imbuto separatore, utilizzando come fase organica diclorometano e come fase acquosa soluzioni di NaHCO₃, H₂O distillata ed H₂O satura di NaCl. La fase organica viene anidrificata mediante Na₂SO₄ anidro, filtrata ed evaporata sotto vuoto ed i prodotti grezzi ottenuti vengono purificati mediante cromatografia su colonna aperta, utilizzando come fase stazionaria gel di silice e come fase mobile una miscela di diclorometano/metanolo (9:1 v/v). La successiva cristallizzazione da dietilere fornisce i composti **10a** (6.17 g, resa 82%) e **10b** (6.35 g, resa 78%).

Procedura generale per la preparazione dei derivati a nucleo picolinico (Schema 3: **11a-v** e **12a-v**)

Una miscela dell'opportuna N-(2-cloroetil)picolinammide **10a** (0.500 g, 2.71 mmol) o di N-(3-cloropropil)picolinammide **10b** (0.500 g, 2.52 mmol) e NaI (in eccesso

del 10%) in acetonitrile (30 mL) viene tenuta sotto agitazione e.m. a riflusso per 30 minuti. Successivamente, viene aggiunto K_2CO_3 (in eccesso del 10%) e l'opportuna piperazina 4-X-sostituita (in quantità equimolare con la rispettiva cloroalchilpicolinammide). La miscela di reazione così ottenuta viene tenuta sotto agitazione e.m. a ricadere per 24 ore. Dopo raffreddamento a temperatura ambiente, la soluzione viene filtrata per allontanare il K_2CO_3 ed il solvente viene allontanato mediante evaporazione sotto vuoto. Il residuo così ottenuto viene ripreso con acqua distillata ed estratto per tre volte, in imbuto separatore, utilizzando diclorometano come fase organica. Le fasi organiche riunite vengono anidificate con Na_2SO_4 anidro, filtrate ed evaporate sotto vuoto ed i prodotti grezzi ottenuti vengono purificati mediante cromatografia su colonna, utilizzando come fase stazionaria gel di silice e come eluente una miscela di opportuni solventi (diclorometano/metanolo o etile acetato/metanolo) in diversi rapporti in funzione della piperazina utilizzata. La successiva cristallizzazione da dietilere fornisce i composti finali **11a-v** e **12a-v**, con rese comprese tra 11-86%. I composti **11u**, **12h** e **12v** sono stati ottenuti in forma pura dopo trasformazione nei corrispondenti sali cloridrati. L'analisi degli spettri NMR delle molecole sintetizzate è consistente con le strutture considerate. In Tabella 6 e Tabella 7 sono riportate le rese percentuali ed i punti di fusione di ciascun prodotto sintetizzato.

Tabella 6. Proprietà chimico-fisiche dei derivati a nucleo picolinico (**11a-v**).



Comp.	X	Formula	P.M.	p.f. (°C)	Resa (%)
11a		C ₁₈ H ₂₂ N ₄ O	310.39	102-103	18
11b		C ₁₉ H ₂₄ N ₄ O ₂	340.42	95-96	35
11c		C ₁₉ H ₂₄ N ₄ O ₂	340.42	105-106	11
11d		C ₂₀ H ₂₆ N ₄ O ₂	354.45	120-122	16
11e		C ₁₉ H ₂₁ N ₅ O	335.40	74-75	23
11f		C ₁₉ H ₂₄ N ₄ O	324.42	110-112	14
11g		C ₂₀ H ₂₆ N ₄ O	338.45	70-71	11
11h		C ₁₈ H ₂₁ ClN ₄ O	344.84	89-90	32
11i		C ₁₈ H ₂₁ ClN ₄ O	344.84	95-96	23
11l		C ₁₈ H ₂₁ ClN ₄ O	344.84	110-111	22
11m		C ₁₈ H ₂₀ Cl ₂ N ₄ O	379.28	115-116	20
11n		C ₁₈ H ₂₁ FN ₄ O	328.38	56-57	16
11o		C ₁₈ H ₂₁ FN ₄ O	328.38	109-111	18
11p		C ₁₇ H ₂₁ N ₅ O	311.38	114-116	35

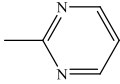
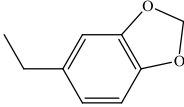
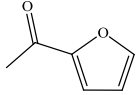
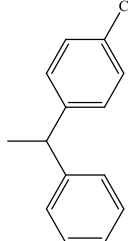
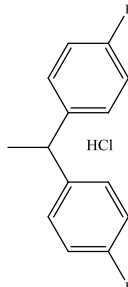
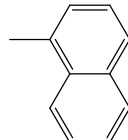
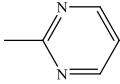
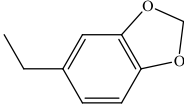
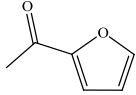
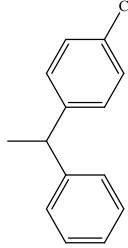
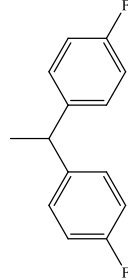
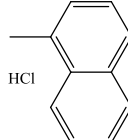
11q		$C_{16}H_{20}N_6O$	312.37	108-110	22
11r		$C_{20}H_{24}N_4O_3$	368.43	92-94	19
11s		$C_{17}H_{20}N_4O_3$	328.37	95-96	36
11t		$C_{25}H_{27}ClN_4O$	434.96	41-42	10
11u		$C_{25}H_{27}ClF_2N_4O$	472.96	191-193	13
11v		$C_{22}H_{24}N_4O$	360.45	66-68	15

Tabella 7. Proprietà chimico-fisiche dei derivati a nucleo picolinico (**12a-v**).

Comp.	X	Formula	P.M.	p.f. (°C)	Resa (%)
12a		C ₁₉ H ₂₄ N ₄ O	324.42	47-48	28
12b		C ₂₀ H ₂₆ N ₄ O ₂	354.45	105-106	45
12c		C ₂₀ H ₂₆ N ₄ O ₂	354.45	89-91	17
12d		C ₂₁ H ₂₈ N ₄ O ₂	368.47	65-66	17
12e		C ₂₀ H ₂₃ N ₅ O	349.43	109-110	47
12f		C ₂₀ H ₂₆ N ₄ O	338.45	74-75	44
12g		C ₂₁ H ₂₈ N ₄ O	352.47	47-49	45
12h		C ₁₉ H ₂₄ Cl ₂ N ₄ O	381.30	185-187	27
12i		C ₁₉ H ₂₃ ClN ₄ O	358.87	77-78	72
12l		C ₁₉ H ₂₃ ClN ₄ O	358.87	81-83	21
12m		C ₁₉ H ₂₂ Cl ₂ N ₄ O	393.31	92-93	37
12n		C ₁₉ H ₂₃ FN ₄ O	342.41	64-65	29
12o		C ₁₉ H ₂₃ FN ₄ O	342.41	62-64	26
12p		C ₁₈ H ₂₃ N ₅ O	325.41	102-103	26

12q		$C_{17}H_{22}N_6O$	326.40	89-91	86
12r		$C_{21}H_{26}N_4O_3$	382.46	82-83	17
12s		$C_{18}H_{22}N_4O_3$	342.39	54-56	56
12t		$C_{26}H_{29}ClN_4O$	448.99	37-39	11
12u		$C_{26}H_{28}F_2N_4O$	450.52	116-118	22
12v		$C_{23}H_{27}ClN_4O$	410.94	201-203	22

CARATTERIZZAZIONE

Tutti i reagenti e le piperazine commercialmente disponibili sono state fornite dalla Sigma-Aldrich.

Tutte le reazioni descritte sono state monitorate mediante cromatografia su strato sottile (TLC) usando lastre di gel di silice del tipo preconfezionato della Merck 60G F-254 con indicatore di fluorescenza, di dimensioni 5x10 cm, come eluente miscele di opportuni solventi e come metodo di visualizzazione una lampada UV (254nm).

I prodotti finali e tutti gli intermedi sono stati ottenuti in forma pura mediante cromatografia su colonna aperta utilizzando come fase stazionaria gel di silice (Macherey-Nagel 60 0,063-0,2mm/70-230 mesh) e come eluente miscele di opportuni solventi. Alcuni composti finali sono stati ottenuti in forma pura mediante trasformazione nei corrispondenti sali cloridrati.

Sia i prodotti finali che gli intermedi di reazione sono stati caratterizzati mediante spettroscopia ^1H -NMR e ^{13}C -NMR. Gli spettri NMR sono stati registrati su uno apparecchio Varian Mercury Plus 400 MHz, utilizzando come solventi CDCl_3 o $\text{DMSO } d_6$. I dati ottenuti sono tutti consistenti con le strutture proposte.

Per i prodotti finali, inoltre, è stata effettuata l'analisi ESI-MS, mediante uno spettrometro di massa API2000, ESI-triplo quadrupolo.

I punti di fusione dei prodotti sintetizzati sono stati determinati mediante apparecchio elettrico Büchi B-540.

Dall'analisi strutturale dei nuovi composti a nucleo N'-cianopicolinamidinico (**4a-q**) emerge che, come già riportato in letteratura, a causa di un equilibrio tautomerico

intorno al carbonio amidinico sp^2 , tali derivati possono presentare due tautomeri (**I** e **II** in Figura 7).

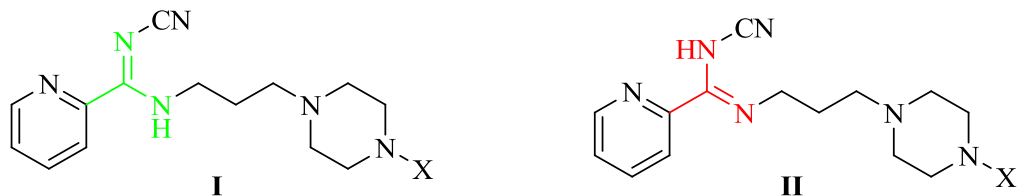


Figura 7. Tautomeri dei derivati N'-cianopicolinamidinici

Gli spettri NMR ottenuti per i composti finali **4a-q** hanno confermato che tutti i prodotti finali esistono, in maniera nettamente predominante, nella forma cianopicolinimminica (**I**), che è risultata essere quella prevalente anche in ulteriori studi riportati [84,86].

Inoltre, per quanto riguarda la determinazione della configurazione degli isomeri geometrici (*E/Z*) sul doppio legame amidinico $C=N$, i derivati **4a-q** esibiscono un solo set di segnali negli esperimenti di 1H -NMR, implicando l'esistenza o di un singolo isomero geometrico o, più probabilmente, di un veloce equilibrio tra le due forme, come già descritto in letteratura [87]. In tale studio, gli autori hanno indagato tale problematica per alcuni composti N-cianoamidinici attraverso studi NMR, verificando che, mentre alcuni derivati mostravano un solo set di segnali, altri ne mostravano due. Tali segnali collassavano in un singolo set quando lo spettro veniva registrato ad una temperatura di 80°C. Tale risultato avvalorava la tesi di un veloce equilibrio tra i due isomeri geometrici; tale equilibrio si ha già a temperatura ambiente per alcuni composti, quali i derivati **4a-q**, mentre per altri l'equilibrio è più lento, determinando la possibilità di identificare la presenza di entrambi gli isomeri attraverso esperimenti di 1H -NMR.

I valori di *chemical shift* ($^1\text{H-NMR}$) ed i dati ESI-MS degli intermedi di reazione e di ciascun prodotto finale sono di seguito riportati:

Metil-N'-ciano-2-piridincarbossimmidato (2)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 4.16 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$); 7.63 (d, 1H, $J=9.4$); 7.94 (t, 1H, $J=7.4$); 7.98 (d, 1H, $J=7.3$); 8.83 (t, 1H, $J=9.4$).

ESI-MS: 162.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

N-(3-bromopropil)-N'-cianopicolinamidina (3)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 2.15 (q, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2$, $J=6.2$); 2.75 (t, 2H, $\text{NH}-\text{CH}_2$, $J=6.2$); 3.83 (q, 2H, CH_2-Br , $J=6.2$); 7.47 (t, 1H, $J=7.3$); 7.86 (t, 1H, $J=7.3$); 8.5 (d, 1H, $J=7.3$); 8.64 (d, 1H, $J=7.3$); 9.62 (bs, 1H, $-\text{NH}$).

ESI-MS: 268.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

N'-ciano-N-(3-(4-allilpiperazin-1-il)propil)picolinamidina (4a)

Da **3** e 1-allilpiperazina.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.83 (m, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2$, $J=6.2$); 2.32 (bs, 4H, 2CH_2 pip.); 2.51 (bs, 4H, 2CH_2 pip.); 2.55 (t, 2H, N^1-CH_2 , $J=5.5$); 3.00 (d, 2H, N^4-CH_2 , $J=6.6$); 3.81 (bs, 2H, $\text{NH}-\text{CH}_2$); 5.14 (dd, 2H, $-\text{CH}=\text{CH}_2$, $J=5.5$, 6.1); 5.81 (m, 1H, $-\text{CH}=\text{CH}_2$); 7.48 (t, 1H, $J=7.3$); 7.87 (t, 1H, $J=7.7$); 8.50 (d, 1H, $J=8.0$); 8.64 (d, 1H, $J=4.4$); 9.75 (bs, 1H, $-\text{NH}$).

ESI-MS: 313.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 335.2 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

N'-ciano-N-(3-(4-(2-metossietil)piperazin-1-il)propil)picolinamidina (4b)

Da **3** e 1-(2-metossietil)piperazina.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.83 (m, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2$, $J=6.2$); 2.28 (bs, 4H, 2CH_2 pip.); 2.38 (t, 2H, N^4-CH_2 , $J=5.4$); 2.55 (bs, 4H, 2CH_2 pip.); 2.57 (t, 2H N^1-CH_2 , $J=5.5$); 3.35 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$); 3.50 (t, 2H $-\text{CH}_2\text{O}-$, $J=5.5$); 3.81 (bs, 2H, $\text{NH}-\text{CH}_2$); 7.47 (t, 1H, $J=7.3$); 7.86 (t, 1H, $J=7.7$); 8.50 (d, 1H, $J=8.0$); 8.64 (d, 1H, $J=5.4$); 9.80 (bs, 1H, $-\text{NH}$).

ESI-MS: 331.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

N'-ciano-N-(3-(4-(2-etossietil)piperazin-1-il)propil)picolinamidina (4c)

Da **3** e 1-(2-etossietil)piperazina.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.17(t, 3H, $-\text{CH}_3$, $J=6.9$); 1.76 (bs, 4H, 2CH_2 pip.); 1.81 (q, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2$, $J=5.8$); 2.55 (t, 2H, N^4-CH_2 , $J=6.2$); 2.56 (bs, 4H, 2CH_2 pip.); 2.58 (t,

$2\text{H } N^1\text{-CH}_2$, $J=6.2$); 3.47 (q, 2H, $-\text{OCH}_2$, $J=6.9$); 3.52 (t, 2H $-\text{CH}_2\text{O-}$, $J=6.2$); 3.81 (bs, 2H, NH-CH_2); 7.46 (t, 1H, $J=7.3$); 7.86 (t, 1H, $J=7.7$); 8.49 (d, 1H, $J=8.0$); 8.64 (d, 1H, $J=4.4$); 9.80 (bs, 1H, $-\text{NH}$).

ESI-MS: 345.4 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 367.1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 383.0 $[\text{M}+\text{K}]^+$.

N'-ciano-N-(3-(4-(2-metossifenil)piperazin-1-il)propil)picolinamidina (4d)

Da **3** e 1-(2-metossifenil)piperazina.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.67(m, 2H, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$); 1.87 (q, 2H, NH-CH_2 , $J=5.5$); 2.65 (t, 2H, $N^1\text{-CH}_2$, $J=5.1$); 2.72 (bs, 4H, 2CH_2 pip.); 3.15 (bs, 4H, 2CH_2 pip.); 3.87 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$); 6.87 (d, 1H, $J=7.4$); 6.89 (d, 1H, $J=7.4$); 6.93 (t, 1H, $J=7.4$); 7.01 (t, 1H, $J=7.4$); 7.41 (t, 1H, $J=7.3$); 7.84 (t, 1H, $J=7.7$); 8.51 (d, 1H, $J=8.0$); 8.55 (d, 1H, $J=4.4$); 10.06 (bs, 1H, $-\text{NH}$).

ESI-MS: 379.4 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 401.6 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 417.5 $[\text{M}+\text{K}]^+$.

N'-ciano-N-(3-(4-(4-metossifenil)piperazin-1-il)propil)picolinamidina (4e)

Da **3** e 1-(4-metossifenil)piperazina.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.90 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$); 2.63 (bs, 4H, 2CH_2 pip.); 2.66 (t, 2H, $N^1\text{-CH}_2$, $J=5.1$); 3.16 (bs, 4H, 2CH_2 pip.); 3.78 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$); 3.88 (bs, 2H, NH-CH_2); 6.84 (d, 2H, $J=8.9$); 6.88 (d, 2H, $J=8.9$); 7.39 (t, 1H, $J=7.3$); 7.83 (t, 1H, $J=7.7$); 8.44 (d, 1H, $J=4.4$); 8.51 (d, 1H, $J=8.0$); 9.97 (bs, 1H, $-\text{NH}$).

ESI-MS: 379.9 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 401.3 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 417.3 $[\text{M}+\text{K}]^+$.

N'-ciano-N-(3-(4-(2-etossifenil)piperazin-1-il)propil)picolinamidina (4f)

Da **3** e 1-(2-etossifenil)piperazina.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.43 (t, $-\text{CH}_3$, $J=6.9$); 1.88 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$); 2.64 (t, 2H, $N^1\text{-CH}_2$, $J=5.1$); 2.71 (bs, 4H, 2CH_2 pip.); 3.17 (bs, 4H, 2CH_2 pip.); 3.86 (bs, 2H, NH-CH_2); 4.04 (q, 2H, $-\text{OCH}_2$, $J=6.9$); 6.85 (d, 1H, $J=7.7$); 6.89 (d, 1H, $J=7.7$); 6.91 (t, 1H, $J=7.7$); 6.96 (t, 1H, $J=7.7$); 7.41 (t, 1H, $J=7.3$); 7.85 (t, 1H, $J=7.7$); 8.50 (d, 1H, $J=8.0$); 8.55 (d, 1H, $J=4.4$); 10.10 (bs, 1H, $-\text{NH}$).

ESI-MS: 393.5 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 415.2 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

N'-ciano-N-(3-(4-(2-cianofenil)piperazin-1-il)propil)picolinamidina (4g)

Da **3** e 2-(piperazin-1-il)benzonitrile.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.88 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$); 2.65 (t, 2H, $N^1\text{-CH}_2$, $J=5.1$); 2.73 (bs, 4H, 2CH_2 pip.); 3.30 (bs, 4H, 2CH_2 pip.); 3.87 (bs, 2H, NH-CH_2); 6.98 (d, 1H,

$J=7.1$); 7.02 (t, 1H, $J=7.1$); 7.44-7.56 (m, 3H); 7.58 (d, 1H, $J=7.3$); 7.86 (t, 1H, $J=7.7$); 8.53 (bs, 1H); 9.78 (bs, 1H, -NH).

ESI-MS: 374.4 $[M+H]^+$, 396.0 $[M+Na]^+$, 412.0 $[M+K]^+$.

N'-ciano-N-(3-(4-(2,3-dimetilfenil)piperazin-1-il)propil)picolinamidina (4h)

Da **3** e 1-(2,3-dimetilfenil)piperazina.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.89 (m, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2$); 2.21 (s, 3H, $-\text{CH}_3$); 2.27 (s, 3H, $-\text{CH}_3$); 2.38 (bs, 4H, 2CH_2 pip.); 2.65 (bs, 4H, 2CH_2 pip.); 2.95 (t, 2H, N^1-CH_2 , $J=5.1$); 3.87 (bs, 2H, $\text{NH}-\text{CH}_2$); 6.87 (d, 1H, $J=7.7$); 6.91 (d, 1H, $J=7.7$); 7.09 (t, 1H, $J=7.7$); 7.44 (t, 1H, $J=7.3$); 7.86 (t, 1H, $J=7.7$); 8.51 (d, 1H, $J=8.0$); 8.62 (d, 1H, $J=4.4$); 10.01 (bs, 1H, -NH).

ESI-MS: 377.9 $[M+H]^+$, 399.0 $[M+Na]^+$, 415.1 $[M+K]^+$.

N'-ciano-N-(3-(4-(2-clorofenil)piperazin-1-il)propil)picolinamidina (4i)

Da **3** e 1-(2-clorofenil)piperazina.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.88 (m, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2$); 2.65 (t, 2H, N^1-CH_2 , $J=5.1$); 2.71 (bs, 4H, 2CH_2 pip.); 3.14 (bs, 4H, 2CH_2 pip.); 3.87 (bs, 2H, $\text{NH}-\text{CH}_2$); 6.97 (d, 1H, $J=8.0$); 7.01 (t, 1H, $J=8.0$); 7.26 (t, 1H, $J=8.0$); 7.36 (d, 1H, $J=8.0$); 7.44 (t, 1H, $J=7.3$); 7.86 (t, 1H, $J=7.7$); 8.53 (d, 1H, $J=8.0$); 8.57 (d, 1H, $J=4.4$); 9.94 (bs, 1H, -NH).

ESI-MS: 383.2 $[M+H]^+$.

N'-ciano-N-(3-(4-(3-clorofenil)piperazin-1-il)propil)picolinamidina (4l)

Da **3** e 1-(3-clorofenil)piperazina.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.89 (m, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2$); 2.63 (bs, 4H, 2CH_2 pip.); 2.66 (t, 2H, N^1-CH_2 , $J=5.1$); 3.25 (bs, 4H, 2CH_2 pip.); 3.87 (bs, 2H, $\text{NH}-\text{CH}_2$); 6.77 (d, 1H, $J=8.0$); 6.82 (d, 1H, $J=8.0$); 6.87 (s, 1H); 7.16 (t, 1H, $J=8.0$); 7.39 (t, 1H, $J=7.3$); 7.83 (t, 1H, $J=7.7$); 8.39 (d, 1H, $J=4.4$); 8.51 (d, 1H, $J=8.0$); 9.96 (bs, 1H, -NH).

ESI-MS: 383.5 $[M+H]^+$.

N'-ciano-N-(3-(4-(3-(trifluorometil)fenil)piperazin-1-il)propil)picolinamidina (4m)

Da **3** e 1-(3-(trifluorometil)fenil)piperazina.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.89 (m, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2$); 2.64 (bs, 4H, 2CH_2 pip.); 2.67 (t, 2H, N^1-CH_2 , $J=5.1$); 3.29 (bs, 4H, 2CH_2 pip.); 3.89 (bs, 2H, $\text{NH}-\text{CH}_2$); 7.06 (d, 1H, $J=8.0$); 7.10 (s, 1H); 7.11 (d, 1H, $J=8.0$); 7.35 (t, 1H, $J=8.0$); 7.39 (t, 1H, $J=7.3$); 7.84 (t, 1H, $J=7.7$); 8.38 (d, 1H, $J=4.4$); 8.51 (d, 1H, $J=8.0$); 9.91 (bs, 1H, -NH).

ESI-MS: 417.6 [M+H]⁺, 439.4 [M+Na]⁺, 455.2 [M+K]⁺.

N'-ciano-N-(3-(4-(pirimidin-2-il)piperazin-1-il)propil)picolinamidina (4n)

Da **3** e 1-(pirimidin-2-il)piperazina.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.89 (m, 2H, -CH₂-CH₂-CH₂); 2.55 (bs, 4H, 2CH₂ pip.); 2.61 (t, 2H, N¹-CH₂, *J*=5.1); 3.58 (bs, 4H, 2CH₂ pip.); 3.90 (bs, 2H, NH-CH₂); 6.49 (t, 1H, *J*=4.4); 7.49 (d, 2H, *J*=4.4); 7.43 (t, 1H, *J*=7.3); 7.85 (t, 1H, *J*=7.7); 8.30 (d, 1H, *J*=4.4); 8.52 (bs, 1H); 9.99 (bs, 1H, -NH).

ESI-MS: 351.0 [M+H]⁺, 373.2 [M+Na]⁺, 389.0 [M+K]⁺.

N'-ciano-N-(3-(4-(piridin-2-il)piperazin-1-il)propil)picolinamidina (4o)

Da **3** e 1-(piridin-2-il)piperazina.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.91 (m, 2H, -CH₂-CH₂-CH₂); 2.62 (bs, 4H, 2CH₂ pip.); 2.72 (t, 2H, N¹-CH₂, *J*=5.1); 3.61 (bs, 4H, 2CH₂ pip.); 3.88 (bs, 2H, NH-CH₂); 6.64 (d, 1H, *J*=8.7); 7.39 (m, 2H); 7.48 (t, 1H, *J*=8.7); 7.83 (t, 1H, *J*=7.3); 8.21 (bs, 1H); 8.42 (d, 1H, *J*=4.4); 8.51 (d, 1H, *J*=8.0); 10.01 (bs, 1H, -NH).

ESI-MS: 350.0 [M+H]⁺, 372.2 [M+Na]⁺, 388.2 [M+K]⁺.

N'-ciano-N-(2-(4-(piperonil)piperazin-1-il)propil)picolinamidina (4p)

Da **3** e 1-(4-piperonil)piperazina.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.82 (m, 2H, -CH₂-CH₂-CH₂); 2.48 (bs, 4H, 2CH₂ pip.); 2.49 (bs, 4H, 2CH₂ pip.); 2.54 (t, 2H, N¹-CH₂, *J*=5.1); 3.44 (s, 2H, CH₂); 3.80 (bs, 2H, NH-CH₂); 5.93 (s, 2H, -OCH₂O); 6.73 (m, 1H, *J*=7.6); 6.83 (m, 2H); 7.51 (t, 1H, *J*=7.3); 7.87 (t, 1H, *J*=7.7); 8.51 (m, 2H,); 9.92 (bs, 1H, -NH).

ESI-MS: 407.3 [M+H]⁺, 429.1 [M+Na]⁺, 445.2 [M+K]⁺.

N'-ciano-N-(3-(4-(2-furoil)piperazin-1-il)propil)picolinamidina (4q)

Da **3** e 1-(2-furoil)piperazina.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.88 (m, 2H, -CH₂-CH₂-CH₂); 2.57 (bs, 4H, 2CH₂ pip.); 2.61 (t, 2H, N¹-CH₂, *J*=5.1); 3.89 (bs, 4H, 2CH₂ pip.); 3.92 (bs, 2H, NH-CH₂); 6.48 (d, 1H, *J*=3.2); 7.01 (d, 1H, *J*=3.2); 7.48 (m, 2H); 7.87 (t, 1H, *J*=7.7); 8.54 (m, 2H); 9.81 (bs, 1H, -NH).

ESI-MS: 367.2 [M+H]⁺, 389.3 [M+Na]⁺, 405.1 [M+K]⁺.

N-(2-cloroetil)isonicotinammide (6a)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 3.60 (q, 2H, $-\text{NH}-\text{CH}_2$, $J=5.4$); 3.85 (t, 2H, $-\text{CH}_2-\text{Cl}$, $J=5.4$); 6.99 (bs, 1H, NH); 7.61 (d, 2H, $J=5.8$); 8.74 (d, 2H, $J=5.8$).

ESI-MS: 185.6 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

N-(2-(4-fenilpiperazin-1-il)etil)isonicotinammide (7a)

Da **6a** e 1-fenilpiperazina.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 2.68 (t, 4H, 2CH_2 pip., $J=4.7$); 2.70 (t, 2H, $-\text{CH}_2-\text{N}^1$, $J=5.4$); 3.22 (t, 4H, 2CH_2 pip., $J=4.7$); 3.59 (q, 2H, $-\text{NH}-\text{CH}_2$, $J=5.4$); 6.87 (t, 1H, $J=6.9$); 6.94 (d, 2H, $J=8.4$); 7.02 (bs, 1H, NH); 7.27 (t, 2H, $J=8.4$); 7.60 (d, 2H, $J=5.8$); 8.73 (d, 2H, $J=5.8$).

ESI-MS: 311.4 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 333.4 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

N-(2-(4-(2-metossifenil)piperazin-1-il)etil)isonicotinammide (7b)

Da **6a** e 1-(2-metossifenil)piperazina.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 2.69 (t, 2H, $-\text{CH}_2-\text{N}^1$, $J=5.4$); 2.72 (t, 4H, 2CH_2 pip., $J=4.7$); 3.11 (t, 4H, 2CH_2 pip., $J=4.7$); 3.59 (q, 2H, $-\text{NH}-\text{CH}_2$, $J=5.4$); 3.86 (s, 3H, OCH_3); 6.88 (d, 1H, $J=6.9$); 6.93 (t, 1H, $J=7.6$); 7.01-7.03 (m, 3H); 7.61 (d, 2H, $J=5.8$); 8.74 (d, 2H, $J=5.8$).

ESI-MS: 341.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

N-(2-(4-(4-metossifenil)piperazin-1-il)etil)isonicotinammide (7c)

Da **6a** e 1-(4-metossifenil)piperazina.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 2.66 (t, 2H, $-\text{CH}_2-\text{N}^1$, $J=5.4$); 2.68 (t, 4H, 2CH_2 pip., $J=4.7$); 3.11 (t, 4H, 2CH_2 pip., $J=4.7$); 3.59 (q, 2H, $-\text{NH}-\text{CH}_2$, $J=5.4$); 3.76 (s, 3H, OCH_3); 6.85 (d, 2H, $J=8.7$); 6.89 (d, 2H, $J=8.7$); 7.02 (bs, 1H, NH); 7.60 (d, 2H, $J=5.8$); 8.72 (d, 2H, $J=5.8$).

ESI-MS: 341.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

N-(2-(4-(2-etossifenil)piperazin-1-il)etil)isonicotinammide (7d)

Da **6a** e 1-(2-etossifenil)piperazina.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.45 (t, 3H, $-\text{CH}_3$, $J=6.2$); 2.69 (t, 2H, $-\text{CH}_2-\text{N}^1$, $J=5.4$); 2.70 (bs, 4H, 2CH_2 pip.); 3.13 (bs, 4H, 2CH_2 pip.); 3.59 (q, 2H, $-\text{NH}-\text{CH}_2$, $J=5.1$); 3.76 (m, 2H, $-\text{OCH}_2$); 6.86 (d, 1H, $J=7.6$); 6.91 (t, 1H, $J=8.7$); 6.95-6.96 (m, 3H); 7.18 (bs, 1H, NH); 7.63 (d, 2H, $J=5.8$); 8.73 (d, 2H, $J=5.8$).

ESI-MS: 355.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

N-(2-(4-(2-cianofenil)piperazin-1-il)etil)isonicotinammide (7e)

Da **6a** e 1-(2-cianofenil)piperazina.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 2.71 (t, 4H, 2CH₂ pip., *J*=4.7); 2.75 (t, 2H, -CH₂-N¹, *J*=5.4); 3.26 (t, 4H, 2CH₂ pip., *J*=4.7); 3.60 (q, 2H, -NH-CH₂, *J*=5.4); 6.93 (bs, 1H, NH); 7.00 (t, 1H, *J*=6.9); 7.02 (d, 1H, *J*=8.4); 7.49 (t, 1H, *J*=8.4); 7.57 (d, 1H, *J*=6.9); 7.62 (d, 2H, *J*=5.8); 8.75 (d, 2H, *J*=5.8).

ESI-MS: 336.1 [M+H]⁺.

N-(2-(4-*o*-tolil)piperazin-1-il)etil)isonicotinammide (7f)

Da **6a** e 1-(*o*-tolil)piperazina.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 2.30 (s, 3H, -CH₃); 2.69 (bs, 2H, -CH₂-N¹); 2.71 (bs, 4H, 2CH₂ pip.); 2.97 (t, 4H, 2CH₂ pip., *J*=4.7); 3.60 (q, 2H, -NH-CH₂, *J*=5.1); 6.97 (t, 1H, *J*=7.6); 7.01 (d, 1H, *J*=7.3); 7.03 (d, 1H, *J*=7.6); 7.08 (bs, 1H, NH); 7.16 (t, 1H, *J*=7.3); 7.64 (d, 2H, *J*=5.8); 8.74 (d, 2H, *J*=5.8).

ESI-MS: 325.2 [M+H]⁺.

N-(2-(4-(2,3-dimetilfenil)piperazin-1-il)etil)isonicotinammide (7g)

Da **6a** e 1-(2,3-dimetilfenil)piperazina.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 2.21 (s, 3H, -CH₃); 2.26 (s, 3H, -CH₃); 2.68 (t, 2H, -CH₂-N¹, *J*=5.4); 2.70 (t, 4H, 2CH₂ pip., *J*=4.7); 2.93 (t, 4H, 2CH₂ pip., *J*=4.7); 3.59 (q, 2H, -NH-CH₂, *J*=5.1); 6.90 (d, 1H, *J*=7.6); 6.99 (d, 1H, *J*=7.3); 7.06 (t, 1H, *J*=7.6); 7.09 (bs, 1H, NH); 7.63 (d, 2H, *J*=5.8); 8.74 (d, 2H, *J*=5.8).

ESI-MS: 339.4 [M+H]⁺.

N-(2-(4-(2-clorofenil)piperazin-1-il)etil)isonicotinammide (7h)

Da **6a** e 1-(2-clorofenil)piperazina.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 2.70 (t, 2H, -CH₂-N¹, *J*=5.4); 2.72 (t, 4H, 2CH₂ pip., *J*=4.7); 3.10 (t, 4H, 2CH₂ pip., *J*=4.7); 3.59 (q, 2H, -NH-CH₂, *J*=5.1); 6.97 (t, 1H, *J*=7.6); 7.03 (d, 1H, *J*=7.3); 7.05 (bs, 1H, NH); 7.22 (t, 1H, *J*=7.3); 7.35 (d, 1H, *J*=7.6); 7.62 (d, 2H, *J*=5.8); 8.74 (d, 2H, *J*=5.8).

ESI-MS: 345.4 [M+H]⁺.

N-(2-(4-(3-clorofenil)piperazin-1-il)etil)isonicotinammide (7i)

Da **6a** e 1-(3-clorofenil)piperazina.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 2.66 (t, 2H, -CH₂-N¹, *J*=5.4); 2.72 (t, 4H, 2CH₂ pip., *J*=4.7); 3.22 (t, 4H, 2CH₂ pip., *J*=4.7); 3.59 (q, 2H, -NH-CH₂, *J*=5.1); 6.78 (t, 1H, *J*=8.7); 6.83 (d, 1H, *J*=8.7); 6.88 (s, 1H); 6.91 (bs, 1H, NH); 7.16 (t, 1H, *J*=8.0); 7.59 (d, 2H, *J*=5.8); 8.73 (d, 2H, *J*=5.8).

ESI-MS: 345.4 [M+H]⁺.

N-(2-(4-(4-clorofenil)piperazin-1-il)etil)isonicotinammide (7l)

Da **6a** e 1-(4-clorofenil)piperazina.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 2.66 (t, 2H, -CH₂-N¹, *J*=5.4); 2.70 (bs, 4H, 2CH₂ pip.); 3.18 (bs, 4H, 2CH₂ pip.); 3.59 (q, 2H, -NH-CH₂, *J*=5.1); 6.83 (d, 2H, *J*=7.6); 6.96 (bs, 1H, NH); 7.19 (d, 2H, *J*=7.3); 7.60 (d, 2H, *J*=5.8); 8.74 (d, 2H, *J*=5.8).

ESI-MS: 345.4 [M+H]⁺.

N-(2-(4-(3,4-diclorofenil)piperazin-1-il)etil)isonicotinammide (7m)

Da **6a** e 1-(3,4-diclorofenil)piperazina.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 2.66 (t, 2H, -CH₂-N¹, *J*=5.4); 2.74 (t, 4H, 2CH₂ pip., *J*=4.7); 3.25 (t, 4H, 2CH₂ pip., *J*=4.7); 3.64 (q, 2H, -NH-CH₂, *J*=5.1); 6.75 (d, 1H, *J*=8.7); 6.96 (s, 1H); 7.15 (bs, 1H, NH); 7.26 (d, 1H, *J*=8.7); 7.64 (d, 2H, *J*=5.8); 8.75 (d, 2H, *J*=5.8).

ESI-MS: 380.3 [M+H]⁺.

N-(2-(4-(2-fluorofenil)piperazin-1-il)etil)isonicotinammide (7n)

Da **6a** e 1-(2-fluorofenil)piperazina.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 2.98 (t, 2H, -CH₂-N¹, *J*=5.4); 3.03 (t, 4H, 2CH₂ pip., *J*=4.7); 3.34 (t, 4H, 2CH₂ pip., *J*=4.7); 3.76 (q, 2H, -NH-CH₂, *J*=5.4); 6.94 (bs, 1H, NH); 6.98-7.01 (m, 2H); 7.05-7.08 (m, 2H); 7.62 (d, 2H, *J*=5.8); 8.75 (d, 2H, *J*=5.8).

ESI-MS: 329.3 [M+H]⁺.

N-(2-(4-(4-fluorofenil)piperazin-1-il)etil)isonicotinammide (7o)

Da **6a** e 1-(4-fluorofenil)piperazina.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 2.68 (t, 2H, -CH₂-N¹, *J*=5.4); 2.71 (t, 4H, 2CH₂ pip., *J*=4.7); 3.14 (t, 4H, 2CH₂ pip., *J*=4.7); 3.59 (q, 2H, -NH-CH₂, *J*=5.4); 6.88 (d, 2H, *J*=8.1); 6.93 (bs, 1H, NH); 6.96 (d, 2H, *J*=8.1); 7.60 (d, 2H, *J*=5.8); 8.74 (d, 2H, *J*=5.8).

ESI-MS: 329.0 [M+H]⁺, 351.2 [M+Na]⁺.

N-(2-(4-(piridin-2-il)piperazin-1-il)etil)isonicotinammide (7p)

Da **6a** e 1-(piridin-2-il)piperazina.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 2.63 (t, 4H, 2CH_2 pip., $J=4.7$); 2.66 (t, 2H, $-\text{CH}_2\text{-N}^1$, $J=5.4$); 3.57 (t, 4H, 2CH_2 pip., $J=4.7$); 3.60 (q, 2H, $-\text{NH-CH}_2$, $J=5.1$); 6.63 (t, 1H, $J=7.6$); 6.66 (d, 1H, $J=7.3$); 7.04 (bs, 1H, NH); 7.48 (t, 1H, $J=7.6$); 7.61 (d, 2H, $J=5.8$); 8.18 (d, 1H, $J=5.8$); 8.73 (d, 2H, $J=5.8$).

ESI-MS: 312.6 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 334.3 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

N-(2-(4-(pirimidin-2-il)piperazin-1-il)etil)isonicotinammide (7q)

Da **6a** e 1-(pirimidin-2-il)piperazina.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 2.57 (t, 4H, 2CH_2 pip., $J=4.7$); 2.66 (t, 2H, $-\text{CH}_2\text{-N}^1$, $J=5.4$); 3.85 (t, 4H, 2CH_2 pip., $J=4.7$); 3.59 (q, 2H, $-\text{NH-CH}_2$, $J=5.4$); 6.50 (t, 1H, $J=8.1$); 6.97 (bs, 1H, NH); 7.62 (d, 2H, $J=5.8$); 8.31 (d, 2H, $J=7.3$); 8.74 (d, 2H, $J=5.8$).

ESI-MS: 313.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 335.1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

N-(2-(4-(piperonil)piperazin-1-il)etil)isonicotinammide (7r)

Da **6a** e 1-(piperonil)piperazina.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 2.49 (t, 2H, $-\text{CH}_2\text{-N}^1$, $J=5.4$); 2.53 (t, 4H, 2CH_2 pip., $J=4.7$); 2.61 (t, 4H, 2CH_2 pip., $J=4.7$); 3.43 (s, 2H, $-\text{CH}_2-$); 3.54 (q, 2H, $-\text{NH-CH}_2$, $J=5.4$); 5.93 (s, 2H, $-\text{OCH}_2$); 6.74 (d, 1H, $J=8.1$); 6.77 (d, 1H, $J=8.3$); 6.84 (s, 1H); 6.98 (bs, 1H, NH); 7.60 (d, 2H, $J=5.8$); 8.74 (d, 2H, $J=5.8$).

ESI-MS: 369.6 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

N-(2-(4-(furoil)piperazin-1-il)etil)isonicotinammide (7s)

Da **6a** e 1-(furoil)piperazina.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 2.51 (t, 4H, 2CH_2 pip., $J=4.7$); 2.59 (t, 2H, $-\text{CH}_2\text{-N}^1$, $J=5.8$); 3.52 (q, 2H, $-\text{NH-CH}_2$, $J=5.1$); 3.77 (t, 4H, 2CH_2 pip., $J=4.7$); 6.42 (d, 1H, $J=8.1$); 6.80 (bs, 1H, NH); 6.94 (d, 1H, $J=8.3$); 7.41 (s, 1H); 7.56 (d, 2H, $J=5.8$); 8.68 (d, 2H, $J=5.8$).

ESI-MS: 329.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 351.2 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 367.2 $[\text{M}+\text{K}]^+$.

N-(2-(4-(4-clorobenzidril)piperazin-1-il)etil)isonicotinammide cloridrato (7t)

Da **6a** e 1-(4-clorobenzidril)piperazina.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO) δ: 2.42 (t, 2H, -CH₂-N¹, *J*=5.8); 2.54 (t, 4H, 2CH₂ pip., *J*=4.7); 2.60 (t, 4H, 2CH₂ pip., *J*=4.7); 3.56 (q, 2H, -NH-CH₂, *J*=5.1); 4.21 (s, 1H, -CH-); 7.02 (bs, 1H, NH); 7.18 (d, 2H, *J*=7.3); 7.22 (t, 1H, *J*=7.6); 7.24 (d, 2H, *J*=7.0); 7.35 (bs, 4H); 7.56 (d, 2H, *J*=5.8); 8.68 (d, 2H, *J*=5.8).

ESI-MS: 435.4 [M+H]⁺.

N-(2-(4-(bis(4-fluorofenil)metil)piperazin-1-il)etil)isonicotinammide cloridrato (7u)

Da **6a** e 1-bis(4-fluorofenil)piperazina.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO) δ: 2.48 (t, 2H, -CH₂-N¹, *J*=5.8); 2.59 (bs, 4H, 2CH₂ pip.); 2.63 (bs, 4H, 2CH₂ pip.); 3.59 (q, 2H, -NH-CH₂, *J*=5.1); 4.25 (s, 1H, -CH-); 7.08 (bs, 1H, NH); 7.18 (q, 4H, *J*=8.5); 7.44 (t, 4H, *J*=7.6); 7.57 (d, 2H, *J*=5.8); 8.68 (d, 2H, *J*=5.8).

ESI-MS: 437.5 [M+H]⁺.

N-(2-(4-(naft-1-il)piperazin-1-il)etil)isonicotinammide cloridrato (7v)

Da **6a** e 1-(naft-1-il)piperazina.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO) δ: 2.77 (t, 4H, 2CH₂ pip., *J*=4.7); 2.82 (t, 2H, -CH₂-N¹, *J*=5.4); 3.11 (t, 4H, 2CH₂ pip., *J*=4.7); 3.64 (q, 2H, -NH-CH₂, *J*=5.4); 7.09 (d, 1H, *J*=7.3); 7.34 (bs, 1H, NH); 7.40 (t, 1H, *J*=7.6); 7.47 (t, 2H, *J*=7.3); 7.55 (d, 1H, *J*=7.6); 7.65 (d, 2H, *J*=5.8); 7.82 (d, 1H, *J*=7.3); 8.19 (d, 1H, *J*=7.3); 8.77 (d, 2H, *J*=5.8).

ESI-MS: 361.6 [M+H]⁺.

N-(3-cloropropil)isonicotinammide (6b)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.86 (m, 2H, -CH₂-CH₂-CH₂, *J*=5.4); 3.60 (q, 2H, -NH-CH₂, *J*=5.4); 3.86 (t, 2H, -CH₂-Cl, *J*=5.4); 7.61 (d, 2H, *J*=5.8); 8.35 (bs, 1H, NH); 8.69 (d, 2H, *J*=5.8).

ESI-MS: 199.7 [M+H]⁺.

N-(3-(4-fenilpiperazin-1-il)propil)isonicotinammide (8a)

Da **6b** e 1-fenilpiperazina.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.84 (m, 2H, -CH₂-CH₂-CH₂, *J*=5.4); 2.64 (t, 2H, -CH₂-N¹, *J*=5.4); 2.68 (t, 4H, 2CH₂ pip., *J*=4.7); 3.18 (t, 4H, 2CH₂ pip., *J*=4.7); 3.60 (q, 2H, -NH-CH₂, *J*=5.4); 6.91 (d, 2H, *J*=7.6); 7.27 (t, 2H, *J*=7.6); 7.30 (t, 1H, *J*=7.6); 7.65 (d, 2H, *J*=5.4); 8.45 (bs, 1H, NH); 8.66 (d, 2H, *J*=5.1).

ESI-MS: 325.6 [M+H]⁺, 347.4 [M+Na]⁺.

N-(3-(4-(2-metossifenil)piperazin-1-il)propil)isonicotinammide (8b)

Da **6b** e 1-(2-metossifenil)piperazina.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.83 (m, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2$, $J=5.4$); 2.67 (t, 2H, $-\text{CH}_2-\text{N}^1$, $J=5.4$); 2.73 (t, 4H, 2CH_2 pip., $J=4.7$); 3.08 (t, 4H, 2CH_2 pip., $J=4.7$); 3.60 (q, 2H, $-\text{NH}-\text{CH}_2$, $J=5.4$); 3.86 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$); 6.86 (d, 1H, $J=7.6$); 6.88 (d, 1H, $J=7.6$); 6.95 (t, 1H, $J=7.3$); 7.03 (t, 1H, $J=7.3$); 7.68 (d, 2H, $J=5.1$); 8.69 (d, 2H, $J=5.1$); 8.81 (bs, 1H, $-\text{NH}$).

ESI-MS: 355.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

N-(3-(4-(4-metossifenil)piperazin-1-il)propil)isonicotinammide (8c)

Da **6b** e 1-(4-metossifenil)piperazina.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.84 (m, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2$, $J=5.4$); 2.65 (t, 2H, $-\text{CH}_2-\text{N}^1$, $J=5.4$); 2.69 (t, 4H, 2CH_2 pip., $J=4.7$); 3.07 (t, 4H, 2CH_2 pip., $J=4.7$); 3.59 (q, 2H, $-\text{NH}-\text{CH}_2$, $J=5.4$); 3.77 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$); 6.86 (bs, 4H); 7.65 (d, 2H, $J=5.1$); 8.56 (bs, 1H, $-\text{NH}$); 8.66 (d, 2H, $J=5.1$).

ESI-MS: 355.5 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

N-(3-(4-(2-etossifenil)piperazin-1-il)propil)isonicotinammide (8d)

Da **6b** e 1-(2-etossifenil)piperazina.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.44 (t, 3H, $-\text{CH}_3$, $J=6.9$); 1.83 (m, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2$, $J=5.4$); 2.66 (t, 2H, $-\text{CH}_2-\text{N}^1$, $J=5.4$); 2.72 (bs, 4H, 2CH_2 pip.); 3.10 (bs, 4H, 2CH_2 pip.); 3.60 (q, 2H, $\text{NH}-\text{CH}_2$, $J=5.4$); 4.05 (q, 2H, $-\text{OCH}_2$, $J=6.9$); 6.84 (d, 1H, $J=7.6$); 6.86 (d, 1H, $J=7.6$); 6.94 (t, 1H, $J=7.3$); 6.99 (t, 1H, $J=7.3$); 7.69 (d, 2H, $J=5.1$); 8.69 (d, 2H, $J=5.1$); 8.74 (bs, 1H, NH).

ESI-MS: 369.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

N-(3-(4-(2-cianofenil)piperazin-1-il)propil)isonicotinammide (8e)

Da **6b** e 1-(2-cianofenil)piperazina.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.73 (m, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2$, $J=5.4$); 2.68 (t, 4H, 2CH_2 pip., $J=4.7$); 2.75 (t, 2H, $-\text{CH}_2-\text{N}^1$, $J=5.4$); 3.20 (t, 4H, 2CH_2 pip., $J=4.7$); 3.63 (q, 2H, $\text{NH}-\text{CH}_2$, $J=5.1$); 6.96 (d, 1H, $J=8.0$); 7.06 (t, 1H, $J=7.3$); 7.52 (t, 1H, $J=7.6$); 7.58 (d, 1H, $J=7.3$); 7.66 (d, 2H, $J=5.8$); 8.37 (bs, 1H, NH); 8.72 (d, 2H, $J=5.8$).

ESI-MS: 350.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 372.4 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

N-(3-(4-*o*-tolil)piperazin-1-il)propil)isonicotinammide (8f)

Da **6b** e 1-(*o*-tolil)piperazina.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.92 (m, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2$, $J=5.4$); 2.28 (s, 3H, $-\text{CH}_3$); 2.73 (t, 2H, $-\text{CH}_2-\text{N}^1$, $J=5.4$); 2.77 (t, 4H, 2CH_2 pip., $J=4.7$); 3.01 (t, 4H, 2CH_2 pip., $J=4.7$); 3.62 (q, 2H, $-\text{NH}-\text{CH}_2$, $J=4.7$); 6.97 (t, 1H, $J=7.3$); 6.99 (t, 1H, $J=7.3$); 7.02 (d, 1H, $J=6.9$); 7.19 (d, 1H, $J=7.3$); 7.75 (d, 2H, $J=5.5$); 8.74 (d, 2H, $J=5.5$); 8.78 (bs, 1H, NH).

ESI-MS: 339.4 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

N-(3-(4-(2,3-dimetilfenil)piperazin-1-il)propil)isonicotinammide (8g)

Da **6b** e 1-(2,3-dimetilfenil)piperazina.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.83 (m, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2$, $J=5.4$); 2.20 (s, 3H, $-\text{CH}_3$); 2.26 (s, 3H, $-\text{CH}_3$); 2.67 (t, 2H, $-\text{CH}_2-\text{N}^1$, $J=5.4$); 2.70 (t, 4H, 2CH_2 pip., $J=4.7$); 2.90 (t, 4H, 2CH_2 pip., $J=4.7$); 3.61 (q, 2H, $-\text{NH}-\text{CH}_2$, $J=4.7$); 6.85 (d, 1H, $J=7.6$); 6.94 (d, 1H, $J=7.3$); 7.10 (t, 1H, $J=7.6$); 7.71 (d, 2H, $J=5.5$); 8.73 (d, 2H, $J=5.5$); 8.77 (bs, 1H, NH).

ESI-MS: 353.5 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

N-(3-(4-(2-clorofenil)piperazin-1-il)propil)isonicotinammide (8h)

Da **6b** e 1-(2-clorofenil)piperazina.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.83 (m, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2$, $J=5.4$); 2.67 (t, 2H, $-\text{CH}_2-\text{N}^1$, $J=5.4$); 2.71 (t, 4H, 2CH_2 pip., $J=4.7$); 3.05 (t, 4H, 2CH_2 pip., $J=4.7$); 3.60 (q, 2H, $-\text{NH}-\text{CH}_2$, $J=5.4$); 6.97 (t, 1H, $J=7.3$); 6.99 (t, 1H, $J=7.3$); 7.22 (d, 1H, $J=7.6$); 7.35 (d, 1H, $J=7.6$); 7.68 (d, 2H, $J=5.5$); 8.63 (bs, 1H, NH); 8.72 (d, 2H, $J=5.5$).

ESI-MS: 359.4 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

N-(3-(4-(3-clorofenil)piperazin-1-il)propil)isonicotinammide (8i)

Da **6b** e 1-(3-clorofenil)piperazina.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.84 (m, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2$, $J=5.4$); 2.62 (t, 2H, $-\text{CH}_2-\text{N}^1$, $J=5.4$); 2.65 (t, 4H, 2CH_2 pip., $J=5.1$); 3.17 (t, 4H, 2CH_2 pip., $J=5.1$); 3.60 (q, 2H, $-\text{NH}-\text{CH}_2$, $J=5.4$); 6.76 (d, 1H, $J=8.0$); 6.83 (s, 1H, $J=7.3$); 6.86 (d, 1H, $J=7.6$); 7.17 (t, 1H, $J=7.6$); 7.63 (d, 2H, $J=5.8$); 8.25 (bs, 1H, NH); 8.67 (d, 2H, $J=5.8$).

ESI-MS: 359.4 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

N-(3-(4-(4-clorofenil)piperazin-1-il)propil)isonicotinammide (8l)

Da **6b** e 1-(4-clorofenil)piperazina.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.83 (m, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2$, $J=5.8$); 2.61 (t, 2H, $-\text{CH}_2-\text{N}^1$, $J=5.4$); 2.66 (t, 4H, 2CH_2 pip., $J=5.1$); 3.14 (t, 4H, 2CH_2 pip., $J=4.4$); 3.59 (q, 2H, $-\text{NH}-$

CH_2 , $J=5.4$); 6.81 (d, 2H, $J=8.7$); 7.20 (d, 2H, $J=9.1$); 7.61 (d, 2H, $J=5.4$); 8.30 (bs, 1H, -NH); 8.66 (d, 2H, $J=5.4$).

ESI-MS: 359.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

N-(3-(4-(3,4-diclorofenil)piperazin-1-il)propil)isonicotinammide (8m)

Da **6b** e 1-(3,4-diclorofenil)piperazina.

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.92 (m, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2$, $J=5.8$); 2.72 (t, 2H, $-\text{CH}_2-\text{N}^1$, $J=5.4$); 2.77 (t, 4H, 2CH_2 pip., $J=5.1$); 3.24 (t, 4H, 2CH_2 pip., $J=4.4$); 3.60 (q, 2H, $-\text{NH}-\text{CH}_2$, $J=5.4$); 6.71 (d, 1H, $J=6.2$); 6.94 (s, 1H); 7.27 (d, 1H, $J=9.1$); 7.66 (d, 2H, $J=5.4$); 8.24 (bs, 1H, -NH); 8.67 (d, 2H, $J=5.4$).

ESI-MS: 393.4 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

N-(3-(4-(2-fluorofenil)piperazin-1-il)propil)isonicotinammide (8n)

Da **6b** e 1-(2-fluorofenil)piperazina.

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.74 (m, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2$, $J=5.4$); 2.66 (t, 2H, $-\text{CH}_2-\text{N}^1$, $J=5.4$); 2.70 (t, 4H, 2CH_2 pip., $J=4.7$); 3.09 (t, 4H, 2CH_2 pip., $J=4.7$); 3.60 (q, 2H, $-\text{NH}-\text{CH}_2$, $J=5.1$); 6.89 (t, 1H, $J=7.6$); 6.98 (t, 1H, $J=7.6$); 7.04 (d, 1H, $J=8.0$); 7.08 (d, 1H, $J=7.3$); 7.66 (d, 2H, $J=5.8$); 8.60 (bs, 1H, NH); 8.70 (d, 2H, $J=5.8$).

ESI-MS: 343.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

N-(3-(4-(4-fluorofenil)piperazin-1-il)propil)isonicotinammide (8o)

Da **6b** e 1-(4-fluorofenil)piperazina.

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.74 (m, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2$, $J=5.4$); 2.64 (t, 2H, $-\text{CH}_2-\text{N}^1$, $J=5.4$); 2.67 (t, 4H, 2CH_2 pip., $J=4.7$); 3.09 (t, 4H, 2CH_2 pip., $J=4.7$); 3.60 (q, 2H, $-\text{NH}-\text{CH}_2$, $J=5.1$); 6.85 (d, 2H, $J=8.0$); 6.97 (d, 2H, $J=8.0$); 7.64 (d, 2H, $J=5.8$); 8.40 (bs, 1H, NH); 8.66 (d, 2H, $J=5.8$).

ESI-MS: 343.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

N-(3-(4-(piridin-2-il)piperazin-1-il)propil)isonicotinammide (8p)

Da **6b** e 1-(piridin-2-il)piperazina.

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.84 (m, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2$, $J=5.4$); 1.95 (t, 2H, $-\text{CH}_2-\text{N}^1$, $J=5.4$); 2.61 (t, 4H, 2CH_2 pip., $J=4.7$); 3.52 (t, 4H, 2CH_2 pip., $J=4.7$); 3.60 (q, 2H, $-\text{NH}-\text{CH}_2$, $J=5.1$); 6.60 (d, 1H, $J=8.4$); 6.65 (t, 1H, $J=7.3$); 7.49 (t, 1H, $J=7.3$); 7.63 (d, 2H, $J=5.5$); 8.18 (d, 1H, $J=5.8$); 8.39 (bs, 1H, NH); 8.65 (d, 2H, $J=5.8$).

ESI-MS: 326.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

N-(3-(4-(pirimidin-2-il)piperazin-1-il)propil)isonicotinammide (8q)

Da **6b** e 1-(pirimidin-2-il)piperazina.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.77 (m, 2H, -CH₂-CH₂-CH₂, *J*=5.4); 2.56 (t, 4H, 2CH₂ pip., *J*=4.7); 2.60 (t, 2H, -CH₂-N¹, *J*=5.4); 3.61 (q, 2H, -NH-CH₂, *J*=5.4); 3.80 (t, 4H, 2CH₂ pip., *J*=4.7); 6.51 (t, 1H, *J*=8.1); 7.64 (d, 2H, *J*=5.8); 8.30 (d, 2H, *J*=8.4); 8.35 (bs, 1H, NH); 8.70 (d, 2H, *J*=5.8).

ESI-MS: 327.3 [M+H]⁺, 349.3 [M+Na]⁺.

N-(3-(4-(piperonil)piperazin-1-il)propil)isonicotinammide (8r)

Da **6b** e 1-(piperonil)piperazina.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.66 (m, 2H, -CH₂-CH₂-CH₂, *J*=5.4); 1.78 (t, 2H, -CH₂-N¹, *J*=5.4); 2.45 (t, 4H, 2CH₂ pip., *J*=4.7); 2.59 (t, 4H, 2CH₂ pip., *J*=4.7); 3.41 (s, 2H, -CH₂-); 3.58 (q, 2H, -NH-CH₂, *J*=5.4); 5.95 (s, 2H, -OCH₂); 6.72 (d, 1H, *J*=8.1); 6.76 (d, 1H, *J*=8.3); 6.82 (s, 1H); 7.66 (d, 2H, *J*=5.8); 8.72 (d, 2H, *J*=5.8); 8.76 (bs, 1H, NH).

ESI-MS: 383.1 [M+H]⁺.

N-(3-(4-(furoil)piperazin-1-il)propil)isonicotinammide (8s)

Da **6b** e 1-(furoil)piperazina.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.82 (m, 2H, -CH₂-CH₂-CH₂, *J*=5.4); 2.54 (t, 4H, 2CH₂ pip., *J*=4.7); 2.58 (t, 2H, -CH₂-N¹, *J*=5.4); 3.58 (q, 2H, -NH-CH₂, *J*=5.4); 3.78 (t, 4H, 2CH₂ pip., *J*=4.7); 6.47 (d, 1H, *J*=7.3); 7.00 (d, 1H, *J*=7.6); 7.46 (t, 1H, *J*=7.3); 7.61 (d, 2H, *J*=5.8); 7.86 (bs, 1H, NH); 8.73 (d, 2H, *J*=5.8).

ESI-MS: 343.3 [M+H]⁺.

N-(3-(4-(4-clorobenzidril)piperazin-1-il)propil)isonicotinammide cloridrato (8t)

Da **6b** e 1-(4-clorobenzidril)piperazina.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO) δ: 1.98 (m, 2H, -CH₂-CH₂-CH₂, *J*=5.4); 2.01 (bs, 4H, 2CH₂ pip.); 3.19 (bs, 6H); 3.36 (q, 2H, -NH-CH₂, *J*=5.1); 3.55 (s, 1H, -CH-); 7.30 (d, 2H, *J*=7.0); 7.38 (d, 2H, *J*=7.3); 7.46 (d, 2H, *J*=7.6); 7.77 (bs, 3H); 8.22 (d, 2H, *J*=7.3); 8.95 (d, 2H, *J*=5.8); 9.41 (bs, 1H, NH);

ESI-MS: 449.4 [M+H]⁺.

N-(3-(4-(bis(4-fluorofenil)metil)piperazin-1-il)propil)isonicotinammide cloridrato (8u)

Da **6b** e 1-bis(4-fluorofenil)piperazina.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO) δ : 1.98 (m, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2$, $J=5.4$); 3.20 (bs, 4H, 2CH_2 pip.); 3.37 (t, 2H, $-\text{CH}_2-\text{N}^1$, $J=5.8$); 3.56 (bs, 4H, 2CH_2 pip.); 4.03 (q, 2H, $-\text{NH}-\text{CH}_2$, $J=5.1$); 4.21 (s, 1H, $-\text{CH}-$); 7.24 (t, 4H, $J=8.5$); 7.84 (bs, 4H); 8.27 (d, 2H, $J=7.9$); 8.98 (d, 2H, $J=7.3$); 9.44 (bs, 1H, NH).

ESI-MS: 451.4 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

N-(3-(4-(naft-1-il)piperazin-1-il)propil)isonicotinammide cloridrato(8v)

Da **6b** e 1-(naft-1-il)piperazina

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO) δ : 1.88 (m, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2$, $J=5.4$); 2.76 (t, 4H, 2CH_2 pip., $J=4.7$); 2.82 (t, 2H, $-\text{CH}_2-\text{N}^1$, $J=5.4$); 3.12 (t, 4H, 2CH_2 pip., $J=4.7$); 3.62 (q, 2H, $-\text{NH}-\text{CH}_2$, $J=5.4$); 7.02 (d, 1H, $J=7.3$); 7.42 (t, 1H, $J=8.0$); 7.45 (d, 1H, $J=7.3$); 7.56 (d, 1H, $J=8.3$); 7.70 (d, 2H, $J=5.8$); 7.81 (t, 2H, $J=8.3$); 7.84 (bs, 1H, NH); 8.14 (d, 1H, $J=8.3$); 8.73 (d, 2H, $J=5.8$).

ESI-MS: 375.4 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

N-(2-cloroetil)picolinamide (10a)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 3.61 (q, 2H, $-\text{NH}-\text{CH}_2$, $J=5.4$); 3.82 (t, 2H, $-\text{CH}_2-\text{Cl}$, $J=5.4$); 7.40 (t, 1H, $J=7.0$); 7.85 (t, 1H, $J=7.0$); 8.19 (d, 1H, $J=7.6$); 8.40 (bs, 1H, NH); 8.56 (d, 1H, $J=5.8$).

ESI-MS: 185.6 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

N-(2-(4-fenilpiperazin-1-il)etil)picolinammide (11a)

Da **10a** e 1-fenilpiperazina.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 2.67 (t, 2H, $-\text{CH}_2-\text{N}^1$, $J=5.4$); 2.70 (t, 4H, 2CH_2 pip., $J=4.7$); 3.24 (t, 4H, 2CH_2 pip., $J=4.7$); 3.62 (q, 2H, $-\text{NH}-\text{CH}_2$, $J=5.4$); 6.87 (t, 1H, $J=6.9$); 6.94 (d, 2H, $J=8.4$); 7.27 (t, 2H, $J=8.4$); 7.41 (t, 1H, $J=7.0$); 7.83 (t, 1H, $J=7.0$); 8.18 (d, 1H, $J=7.6$); 8.37 (bs, 1H, NH); 8.55 (d, 1H, $J=5.8$).

ESI-MS: 311.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 333.0 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 349.2 $[\text{M}+\text{K}]^+$.

N-(2-(4-(2-metossifenil)piperazin-1-il)etil)picolinammide (11b)

Da **10a** e 1-(2-metossifenil)piperazina.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 2.69 (t, 2H, $-\text{CH}_2-\text{N}^1$, $J=5.4$); 2.73 (t, 4H, 2CH_2 pip., $J=4.7$); 3.12 (t, 4H, 2CH_2 pip., $J=4.7$); 3.62 (q, 2H, $-\text{NH}-\text{CH}_2$, $J=5.4$); 3.86 (s, 3H, OCH_3); 6.87 (d, 1H, $J=7.0$); 6.95-6.99 (m, 3H); 7.41 (t, 1H, $J=7.0$); 7.83 (t, 1H, $J=7.0$); 8.19 (d, 1H, $J=7.6$); 8.36 (bs, 1H, NH); 8.56 (d, 1H, $J=5.8$).

ESI-MS: 341.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 363.2 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 379.2 $[\text{M}+\text{K}]^+$.

N-(2-(4-(4-metossifenil)piperazin-1-il)etil)picolinammide (11c)

Da **10a** e 1-(4-metossifenil)piperazina.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 2.66 (t, 2H, -CH₂-N¹, *J*=5.4); 2.69 (bs, 4H, 2CH₂ pip.); 3.13 (bs, 4H, 2CH₂ pip.); 3.63 (q, 2H, -NH-CH₂, *J*=5.4); 3.76 (s, 3H, -OCH₃); 6.84 (d, 2H, *J*=8.7); 6.89 (d, 2H, *J*=8.7); 7.41 (t, 1H, *J*=7.0); 7.83 (t, 1H, *J*=7.0); 8.18 (d, 1H, *J*=7.6); 8.36 (bs, 1H, NH); 8.55 (d, 1H, *J*=5.8).

ESI-MS: 341.3 [M+H]⁺, 363.2 [M+Na]⁺.

N-(2-(4-(2-etossifenil)piperazin-1-il)etil)picolinammide (11d)

Da **10a** e 1-(2-etossifenil)piperazina.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.43 (t, 3H, -CH₃, *J*=6.7); 3.23 (t, 2H, -CH₂-N¹, *J*=5.4); 3.63 (t, 4H, 2CH₂ pip., *J*=4.7); 3.54 (t, 4H, 2CH₂ pip., *J*=4.7); 3.59 (q, 2H, -NH-CH₂, *J*=5.1); 4.07 (m, 2H, -OCH₂); 6.86 (d, 1H, *J*=7.3); 6.89 (t, 1H, *J*=8.7); 6.97 (d, 1H, *J*=7.3); 7.04 (t, 1H, *J*=8.7); 7.44 (t, 1H, *J*=7.0); 7.84 (t, 1H, *J*=7.0); 8.12 (d, 1H, *J*=7.6); 8.59 (d, 1H, *J*=5.8); 8.67 (bs, 1H, NH).

ESI-MS: 355.1 [M+H]⁺, 377.4 [M+Na]⁺.

N-(2-(4-(2-cianofenil)piperazin-1-il)etil)picolinammide (11e)

Da **10a** e 1-(2-cianofenil)piperazina.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 2.69 (t, 2H, -CH₂-N¹, *J*=5.4); 2.72 (t, 4H, 2CH₂ pip., *J*=4.7); 3.27 (t, 4H, 2CH₂ pip., *J*=4.7); 3.62 (q, 2H, -NH-CH₂, *J*=5.1); 6.97 (t, 1H, *J*=9.8); 7.02 (d, 1H, *J*=7.3); 7.42 (t, 1H, *J*=7.0); 7.47 (t, 1H, *J*=7.9); 7.54 (d, 1H, *J*=7.3); 7.84 (t, 1H, *J*=8.0); 8.19 (d, 1H, *J*=7.6); 8.34 (bs, 1H, NH); 8.56 (d, 1H, *J*=5.8).

ESI-MS: 336.0 [M+H]⁺, 358.0 [M+H]⁺.

N-(2-(4-(*o*-tolil)piperazin-1-il)etil)picolinammide (11f)

Da **10a** e 1-(*o*-tolil)piperazina.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 2.30 (s, 3H, -CH₃); 2.69 (bs, 2H, -CH₂-N¹); 2.71 (bs, 4H, 2CH₂ pip.); 2.98 (t, 4H, 2CH₂ pip., *J*=4.7); 3.59 (q, 2H, -NH-CH₂, *J*=5.1); 6.97 (t, 1H, *J*=7.6); 7.01 (d, 1H, *J*=7.3); 7.03 (d, 1H, *J*=7.6); 7.16 (t, 1H, *J*=7.3); 7.54 (d, 1H, *J*=7.3); 7.84 (t, 1H, *J*=8.0); 8.18 (d, 1H, *J*=7.6); 8.35 (bs, 1H, NH); 8.56 (d, 1H, *J*=5.8).

ESI-MS: 325.3 [M+H]⁺.

N-(2-(4-(2,3-dimetilfenil)piperazin-1-il)etil)picolinammide (11g)

Da **10a** e 1-(2,3-dimetilfenil)piperazina.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 2.21 (s, 3H, $-\text{CH}_3$); 2.26 (s, 3H, $-\text{CH}_3$); 2.74 (t, 2H, $-\text{CH}_2-\text{N}^1$, $J=5.4$); 2.76 (t, 4H, 2CH_2 pip., $J=4.7$); 2.97 (t, 4H, 2CH_2 pip., $J=4.7$); 3.67 (q, 2H, $-\text{NH}-\text{CH}_2$, $J=4.7$); 6.89 (t, 1H, $J=7.0$); 6.91 (d, 1H, $J=7.9$); 7.07 (t, 1H, $J=7.0$); 7.42 (t, 1H, $J=7.3$); 7.84 (t, 1H, $J=8.0$); 8.18 (d, 1H, $J=7.6$); 8.41 (bs, 1H, NH); 8.58 (d, 1H, $J=5.8$).

ESI-MS: 339.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

N-(2-(4-(2-clorofenil)piperazin-1-il)etil)picolinammide (11h)

Da **10a** e 1-(2-clorofenil)piperazina.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 2.76 (t, 2H, $-\text{CH}_2-\text{N}^1$, $J=5.4$); 2.79 (t, 4H, 2CH_2 pip., $J=4.7$); 3.16 (t, 4H, 2CH_2 pip., $J=4.7$); 3.68 (q, 2H, $-\text{NH}-\text{CH}_2$, $J=5.1$); 6.97 (t, 1H, $J=7.6$); 7.07 (d, 1H, $J=7.3$); 7.20 (t, 1H, $J=7.3$); 7.34 (d, 1H, $J=7.6$); 7.42 (t, 1H, $J=7.0$); 7.84 (t, 1H, $J=7.0$); 8.18 (d, 1H, $J=7.6$); 8.40 (bs, 1H, NH); 8.57 (d, 1H, $J=5.8$).

ESI-MS: 345.4 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

N-(2-(4-(3-clorofenil)piperazin-1-il)etil)picolinammide (11i)

Da **10a** e 1-(3-clorofenil)piperazina.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 2.64 (t, 2H, $-\text{CH}_2-\text{N}^1$, $J=5.4$); 2.67 (t, 4H, 2CH_2 pip., $J=4.8$); 3.23 (t, 4H, 2CH_2 pip., $J=4.8$); 3.63 (q, 2H, $-\text{NH}-\text{CH}_2$, $J=5.1$); 6.77 (d, 1H, $J=8.1$); 6.80 (d, 1H, $J=8.3$); 6.88 (s, 1H); 7.15 (t, 1H, $J=7.9$); 7.41 (t, 1H, $J=7.0$); 7.84 (t, 1H, $J=7.3$); 8.18 (d, 1H, $J=7.9$); 8.35 (bs, 1H, NH); 8.56 (d, 1H, $J=5.8$).

ESI-MS: 345.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 367.2 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

N-(2-(4-(4-clorofenil)piperazin-1-il)etil)picolinammide (11l)

Da **10a** e 1-(4-clorofenil)piperazina.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 2.65 (t, 2H, $-\text{CH}_2-\text{N}^1$, $J=5.4$); 2.68 (t, 4H, 2CH_2 pip., $J=4.7$); 3.19 (t, 4H, 2CH_2 pip., $J=4.7$); 3.62 (q, 2H, $-\text{NH}-\text{CH}_2$, $J=5.1$); 6.83 (d, 2H, $J=8.8$); 7.18 (d, 2H, $J=8.8$); 7.41 (t, 1H, $J=7.3$); 7.83 (t, 1H, $J=8.0$); 8.18 (d, 1H, $J=7.6$); 8.35 (bs, 1H, NH); 8.54 (d, 1H, $J=5.8$).

ESI-MS: 345.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 367.1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 383.1 $[\text{M}+\text{K}]^+$.

N-(2-(4-(3,4-diclorofenil)piperazin-1-il)etil)picolinammide (11m)

Da **10a** e 1-(3,4-diclorofenil)piperazina.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.67 (t, 2H, $-\text{CH}_2-\text{N}^1$, $J=5.4$); 2.67 (t, 4H, 2CH_2 pip., $J=4.7$); 3.20 (t, 4H, 2CH_2 pip., $J=4.7$); 3.61 (q, 2H, $-\text{NH}-\text{CH}_2$, $J=5.1$); 6.75 (d, 1H, $J=8.8$); 6.95 (d, 1H, $J=8.7$); 7.25 (s, 1H); 7.42 (t, 1H, $J=7.3$); 7.84 (t, 1H, $J=8.0$); 8.18 (d, 1H, $J=7.6$); 8.34 (bs, 1H, NH); 8.55 (d, 1H, $J=5.8$).

ESI-MS: 379.1 [M+H]⁺.

N-(2-(4-(2-fluorofenil)piperazin-1-il)etil)picolinammide (11n)

Da **10a** e 1-(2-fluorofenil)piperazina.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.75 (t, 2H, -CH₂-N¹, *J*=5.4); 2.71 (t, 4H, 2CH₂ pip., *J*=4.7); 3.15 (t, 4H, 2CH₂ pip., *J*=4.7); 3.62 (q, 2H, -NH-CH₂, *J*=5.1); 6.94 (d, 1H, *J*=7.9); 6.98 (t, 1H, *J*=7.6); 7.02-7.04 (m, 2H); 7.41 (t, 1H, *J*=7.3); 7.84 (t, 1H, *J*=8.0); 8.18 (d, 1H, *J*=7.6); 8.35 (bs, 1H, NH); 8.56 (d, 1H, *J*=5.8).

ESI-MS: 329.7 [M+H]⁺.

N-(2-(4-(4-fluorofenil)piperazin-1-il)etil)picolinammide (11o)

Da **10a** e 1-(4-fluorofenil)piperazina.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.65 (t, 2H, -CH₂-N¹, *J*=5.4); 2.68 (t, 4H, 2CH₂ pip., *J*=4.7); 3.15 (t, 4H, 2CH₂ pip., *J*=4.7); 3.62 (q, 2H, -NH-CH₂, *J*=5.4); 6.88 (d, 2H, *J*=8.2); 6.96 (d, 2H, *J*=8.2); 7.41 (t, 1H, *J*=7.3); 7.84 (t, 1H, *J*=8.0); 8.18 (d, 1H, *J*=7.6); 8.35 (bs, 1H, NH); 8.55 (d, 1H, *J*=5.8).

ESI-MS: 329.7 [M+H]⁺, 351.4 [M+Na]⁺.

N-(2-(4-(piridin-2-il)piperazin-1-il)etil)picolinammide (11p)

Da **10a** e 1-(piridin-2-il)piperazina.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 2.64 (t, 4H, 2CH₂ pip., *J*=4.7); 2.67 (t, 2H, -CH₂-N¹, *J*=5.4); 3.58 (t, 4H, 2CH₂ pip., *J*=4.7); 3.62 (q, 2H, -NH-CH₂, *J*=5.1); 6.61 (d, 1H, *J*=7.0); 6.63 (d, 1H, *J*=8.8); 7.41 (t, 1H, *J*=7.0); 7.47 (t, 1H, *J*=7.0); 7.83 (t, 1H, *J*=7.6); 8.18 (d, 2H, *J*=7.3); 8.38 (bs, 1H, NH); 8.56 (d, 1H, *J*=5.8).

ESI-MS: 312.1 [M+H]⁺, 334.2 [M+Na]⁺, 350.0 [M+K]⁺.

N-(2-(4-(pirimidin-2-il)piperazin-1-il)etil)picolinammide (11q)

Da **10a** e 1-(pirimidin-2-il)piperazina.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 2.58 (t, 4H, 2CH₂ pip., *J*=4.7); 2.66 (t, 2H, -CH₂-N¹, *J*=4.6); 3.62 (q, 2H, -NH-CH₂, *J*=5.4); 3.85 (t, 4H, 2CH₂ pip., *J*=4.7); 6.47 (t, 1H, *J*=8.0); 7.41 (t, 1H, *J*=7.0); 7.83 (t, 1H, *J*=7.6); 8.18 (d, 1H, *J*=7.6); 8.30 (d, 2H, *J*=7.6); 8.38 (bs, 1H, NH); 8.56 (d, 1H, *J*=5.8).

ESI-MS: 313.1 [M+H]⁺, 335.0 [M+Na]⁺.

N-(2-(4-(piperonil)piperazin-1-il)etil)picolinammide (11r)

Da **10a** e 1-(piperonil)piperazina.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 2.49 (t, 2H, $-\text{CH}_2-\text{N}^1$, $J=5.4$); 2.54 (t, 4H, 2CH_2 pip., $J=4.7$); 2.61 (t, 4H, 2CH_2 pip., $J=4.7$); 3.42 (s, 2H, $-\text{CH}_2-$); 3.58 (q, 2H, $-\text{NH}-\text{CH}_2$, $J=5.4$); 5.93 (s, 2H, $-\text{OCH}_2$); 6.73 (bs, 2H); 6.85 (s, 1H); 7.41 (t, 1H, $J=7.0$); 7.83 (t, 1H, $J=7.3$); 8.18 (d, 1H, $J=7.9$); 8.29 (bs, 1H, NH); 8.55 (d, 1H, $J=5.8$).

ESI-MS: 369.4 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

N-(2-(4-(furoil)piperazin-1-il)etil)picolinammide (11s)

Da **10a** e 1-(furoil)piperazina.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 2.57 (t, 4H, 2CH_2 pip., $J=4.7$); 2.65 (t, 2H, $-\text{CH}_2-\text{N}^1$, $J=5.8$); 3.60 (q, 2H, $-\text{NH}-\text{CH}_2$, $J=5.1$); 3.83 (t, 4H, 2CH_2 pip., $J=4.7$); 6.46 (d, 1H, $J=8.1$); 6.98 (d, 1H, $J=8.3$); 7.42 (t, 1H, $J=7.0$); 7.47 (t, 1H, $J=7.0$); 7.84 (t, 1H, $J=7.3$); 8.18 (d, 1H, $J=7.9$); 8.34 (bs, 1H, NH); 8.56 (d, 1H, $J=5.8$).

ESI-MS: 329.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 351.0 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 367.0 $[\text{M}+\text{K}]^+$.

N-(2-(4-(4-clorobenzidril)piperazin-1-il)etil)picolinammide (11t)

Da **10a** e 1-(4-clorobenzidril)piperazina.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 2.43 (t, 2H, $-\text{CH}_2-\text{N}^1$, $J=5.8$); 2.54 (t, 4H, 2CH_2 pip., $J=4.7$); 2.61 (t, 4H, 2CH_2 pip., $J=4.7$); 3.57 (q, 2H, $-\text{NH}-\text{CH}_2$, $J=5.1$); 4.21 (s, 1H, $-\text{CH}-$); 7.18 (d, 2H, $J=7.3$); 7.22 (t, 1H, $J=7.6$); 7.24 (d, 2H, $J=7.0$); 7.35 (bs, 4H); 7.40 (t, 1H, $J=7.0$); 7.82 (t, 1H, $J=7.0$); 8.16 (d, 1H, $J=7.6$); 8.28 (bs, 1H, NH); 8.55 (d, 1H, $J=5.8$).

ESI-MS: 435.9 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

N-(2-(4-(bis(4-fluorofenil)metil)piperazin-1-il)etil)picolinammide cloridrato (11u)

Da **10a** e 1-bis(4-fluorofenil)piperazina.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO) δ : 2.31 (t, 2H, $-\text{CH}_2-\text{N}^1$, $J=5.8$); 2.75 (t, 4H, 2CH_2 pip., $J=4.7$); 3.09 (t, 4H, 2CH_2 pip., $J=4.7$); 3.63 (q, 2H, $-\text{NH}-\text{CH}_2$, $J=5.1$); 4.54 (s, 1H, $-\text{CH}-$); 7.13 (t, 4H, $J=8.5$); 7.42 (t, 4H, $J=7.6$); 7.59 (t, 1H, $J=7.0$); 7.98 (t, 1H, $J=7.0$); 8.02 (d, 1H, $J=7.0$); 8.63 (d, 1H, $J=7.6$); 9.09 (bs, 1H, NH).

ESI-MS: 437.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

N-(2-(4-(naft-1-il)piperazin-1-il)etil)picolinammide (11v)

Da **10a** e 1-(naft-1-il)piperazina.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 2.79 (t, 4H, 2CH_2 pip., $J=4.7$); 2.88 (t, 2H, $-\text{CH}_2-\text{N}^1$, $J=5.4$); 3.21 (t, 4H, 2CH_2 pip., $J=4.7$); 3.70 (q, 2H, $-\text{NH}-\text{CH}_2$, $J=6.1$); 7.10 (d, 1H, $J=7.3$);

7.40 (d, 1H, $J=7.6$); 7.42 (t, 1H, $J=7.3$); 7.47 (t, 2H, $J=7.0$); 7.54 (d, 1H, $J=7.6$); 7.65 (d, 1H, $J=5.8$); 7.82 (d, 1H, $J=7.3$); 8.18 (d, 1H, $J=7.3$); 8.21 (d, 1H, $J=7.3$); 8.42 (bs, 1H, NH); 8.58 (d, 1H, $J=5.8$).

ESI-MS: 361.4 $[M+H]^+$, 383.2 $[M+Na]^+$.

N-(3-cloropropil)picolinammide (10b)

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 1.86 (m, 2H, $-CH_2-CH_2-CH_2$, $J=5.4$); 3.60 (q, 2H, $-NH-CH_2$, $J=5.4$); 3.86 (t, 2H, $-CH_2-Cl$, $J=5.4$); 7.35 (t, 1H, $J=7.0$); 7.83 (t, 1H, $J=7.0$); 8.18 (d, 1H, $J=7.6$); 8.42 (d, 1H, $J=5.8$); 9.02 (bs, 1H, NH).

ESI-MS: 199.7 $[M+H]^+$.

N-(3-(4-fenilpiperazin-1-il)propil)picolinammide (12a)

Da **10b** e 1-fenilpiperazina.

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 1.84 (m, 2H, $-CH_2-CH_2-CH_2$, $J=5.4$); 2.59 (t, 2H, $-CH_2-N^1$, $J=5.4$); 2.66 (t, 4H, $2CH_2$ pip., $J=4.7$); 3.29 (t, 4H, $2CH_2$ pip., $J=4.7$); 3.58 (q, 2H, $-NH-CH_2$, $J=5.4$); 6.86 (t, 1H, $J=7.6$); 6.93 (d, 2H, $J=7.3$); 7.27 (t, 2H, $J=8.2$); 7.35 (t, 1H, $J=8.0$); 7.81 (t, 1H, $J=7.1$); 8.16 (d, 1H, $J=7.4$); 8.41 (d, 1H, $J=5.8$); 9.05 (bs, 1H, NH).

ESI-MS: 325.1 $[M+H]^+$, 347.2 $[M+Na]^+$.

N-(3-(4-(2-metossifenil)piperazin-1-il)propil)picolinammide (12b)

Da **10b** e 1-(2-metossifenil)piperazina.

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 1.84 (m, 2H, $-CH_2-CH_2-CH_2$, $J=5.4$); 2.60 (t, 2H, $-CH_2-N^1$, $J=5.4$); 2.70 (t, 4H, $2CH_2$ pip., $J=4.7$); 3.18 (t, 4H, $2CH_2$ pip., $J=4.7$); 3.60 (q, 2H, $-NH-CH_2$, $J=5.4$); 3.86 (s, 3H, $-OCH_3$); 6.86 (d, 1H, $J=7.6$); 6.94-6.96 (m, 3H, $J=7.6$); 7.37 (t, 1H, $J=8.0$); 7.81 (t, 1H, $J=7.3$); 8.17 (d, 1H, $J=7.6$); 8.50 (d, 1H, $J=5.8$); 9.10 (bs, 1H, NH).

ESI-MS: 355.3 $[M+H]^+$, 377.4 $[M+Na]^+$, 393.3 $[M+K]^+$.

N-(3-(4-(4-metossifenil)piperazin-1-il)propil)picolinammide (12c)

Da **10b** e 1-(4-metossifenil)piperazina.

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 1.84 (m, 2H, $-CH_2-CH_2-CH_2$, $J=5.4$); 2.58 (t, 2H, $-CH_2-N^1$, $J=5.4$); 2.66 (bs, 4H, $2CH_2$ pip.); 3.18 (bs, 4H, $2CH_2$ pip.); 3.59 (q, 2H, $-NH-CH_2$, $J=5.4$); 3.77 (s, 3H, $-OCH_3$); 6.86 (d, 2H, $J=8.5$); 6.90 (d, 2H, $J=8.5$); 7.36 (t, 1H, $J=8.0$); 7.81 (t, 1H, $J=7.3$); 8.17 (d, 1H, $J=7.6$); 8.43 (d, 1H, $J=5.8$); 9.05 (bs, 1H, NH).

ESI-MS: 355.4 $[M+H]^+$, 377.4 $[M+Na]^+$, 393.4 $[M+K]^+$.

N-(3-(4-(2-etossifenil)piperazin-1-il)propil)picolinammide (12d)

Da **10b** e 1-(2-etossifenil)piperazina.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.44 (t, 3H, $-\text{CH}_3$, $J=6.7$); 1.89 (m, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2$, $J=5.4$); 2.64 (t, 2H, $-\text{CH}_2-\text{N}^1$, $J=5.4$); 2.75 (bs, 4H, 2CH_2 pip.); 3.23 (bs, 4H, 2CH_2 pip.); 3.59 (q, 2H, $\text{NH}-\text{CH}_2$, $J=5.4$); 4.05 (q, 2H, $-\text{OCH}_2$, $J=6.9$); 6.86 (d, 1H, $J=7.6$); 6.94 (bs, 3H); 7.38 (t, 1H, $J=8.0$); 7.82 (t, 1H, $J=7.3$); 8.17 (d, 1H, $J=7.6$); 8.50 (d, 1H, $J=5.8$); 9.04 (bs, 1H, NH).

ESI-MS: 369.4 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 391.3 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

N-(3-(4-(2-cianofenil)piperazin-1-il)propil)picolinammide (12e)

Da **10b** e 1-(2-cianofenil)piperazina.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.84 (m, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2$, $J=5.4$); 2.61 (t, 2H, $-\text{CH}_2-\text{N}^1$, $J=5.4$); 2.71 (bs, 4H, 2CH_2 pip.); 3.33 (bs, 4H, 2CH_2 pip.); 3.60 (q, 2H, $-\text{NH}-\text{CH}_2$, $J=5.1$); 7.01 (d, 1H, $J=8.0$); 7.03 (d, 1H, $J=7.3$); 7.39 (t, 1H, $J=7.6$); 7.48 (t, 1H, $J=7.3$); 7.56 (d, 1H, $J=7.3$); 7.83 (t, 1H, $J=7.6$); 8.19 (d, 1H, $J=7.6$); 8.49 (d, 1H, $J=7.6$); 8.97 (bs, 1H, NH).

ESI-MS: 350.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 372.0 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

N-(3-(4-*o*-tolil)piperazin-1-il)propil)picolinammide (12f)

Da **10b** e 1-(*o*-tolil)piperazina.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.90 (m, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2$, $J=5.4$); 2.28 (s, 3H, $-\text{CH}_3$); 2.73 (t, 2H, $-\text{CH}_2-\text{N}^1$, $J=5.4$); 2.76 (bs, 4H, 2CH_2 pip.); 3.01 (bs, 4H, 2CH_2 pip.); 3.62 (q, 2H, $-\text{NH}-\text{CH}_2$, $J=4.7$); 6.95 (t, 1H, $J=7.3$); 6.99 (t, 1H, $J=7.3$); 7.02 (d, 1H, $J=6.9$); 7.19 (d, 1H, $J=7.3$); 7.37 (t, 1H, $J=8.0$); 7.82 (t, 1H, $J=7.3$); 8.17 (d, 1H, $J=7.6$); 8.52 (d, 1H, $J=5.8$); 9.03 (bs, 1H, $-\text{NH}$).

ESI-MS: 339.5 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

N-(3-(4-(2,3-dimetilfenil)piperazin-1-il)propil)picolinammide (12g)

Da **10b** e 1-(2,3-dimetilfenil)piperazina.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.89 (m, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2$, $J=5.4$); 2.21 (s, 3H, $-\text{CH}_3$); 2.26 (s, 3H, $-\text{CH}_3$); 2.65 (bs, 4H, 2CH_2 pip.); 2.71 (t, 2H, $-\text{CH}_2-\text{N}^1$, $J=5.4$); 3.02 (bs, 4H, 2CH_2 pip.); 3.59 (q, 2H, $-\text{NH}-\text{CH}_2$, $J=4.7$); 6.92 (d, 1H, $J=7.6$); 6.94 (d, 1H, $J=7.3$); 7.10 (t, 1H, $J=7.6$); 7.40 (t, 1H, $J=7.4$); 7.82 (t, 1H, $J=7.6$); 8.18 (d, 1H, $J=7.6$); 8.54 (d, 1H, $J=7.6$); 9.00 (bs, 1H, $-\text{NH}$).

ESI-MS: 353.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

N-(3-(4-(2-clorofenil)piperazin-1-il)propil)picolinammide cloridrato (12h)

Da **10b** e 1-(2-clorofenil)piperazina.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO) δ: 2.03 (m, 2H, -CH₂-CH₂-CH₂, *J*=5.4); 3.17 (t, 4H, 2CH₂ pip., *J*=4.7); 3.21 (t, 2H, -CH₂-N¹, *J*=5.4); 3.38 (t, 4H, 2CH₂ pip., *J*=4.7); 3.53 (q, 2H, NH-CH₂, *J*=5.4); 7.08 (t, 1H, *J*=7.0); 7.18 (d, 1H, *J*=7.4); 7.22 (t, 1H, *J*=7.0); 7.35 (d, 1H, *J*=7.4); 7.62 (t, 1H, *J*=8.0); 8.06 (t, 1H, *J*=7.3); 8.32 (d, 1H, *J*=7.6); 8.65 (d, 1H, *J*=5.8); 9.05 (bs, 1H, NH).

ESI-MS: 359.2 [M+H]⁺.

N-(3-(4-(3-clorofenil)piperazin-1-il)propil)picolinammide (12i)

Da **10b** e 1-(3-clorofenil)piperazina.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.84 (m, 2H, -CH₂-CH₂-CH₂, *J*=5.4); 2.58 (t, 2H, -CH₂-N¹, *J*=5.4); 2.63 (t, 4H, 2CH₂ pip., *J*=5.1); 3.28 (t, 4H, 2CH₂ pip., *J*=5.1); 3.59 (q, 2H, NH-CH₂, *J*=5.4); 6.80 (m, 2H); 6.88 (s, 1H, *J*=7.3); 7.17 (t, 1H, *J*=8.2); 7.36 (t, 1H, *J*=7.4); 7.81 (t, 1H, *J*=7.6); 8.17 (d, 1H, *J*=7.3); 8.40 (d, 1H, *J*=7.6); 9.03 (bs, 1H, NH).

ESI-MS: 359.2 [M+H]⁺, 381.3 [M+Na]⁺, 397.3 [M+K]⁺.

N-(3-(4-(4-clorofenil)piperazin-1-il)propil)picolinammide (12l)

Da **10b** e 1-(4-clorofenil)piperazina.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.84 (m, 2H, -CH₂-CH₂-CH₂, *J*=5.8); 2.58 (t, 2H, -CH₂-N¹, *J*=5.4); 2.64 (bs, 4H, 2CH₂ pip.); 3.25 (bs, 4H, 2CH₂ pip.); 3.58 (q, 2H, -NH-CH₂, *J*=5.4); 6.86 (d, 2H, *J*=8.2); 7.20 (d, 2H, *J*=8.2); 7.36 (t, 1H, *J*=7.4); 7.81 (t, 1H, *J*=7.6); 8.17 (d, 1H, *J*=7.3); 8.39 (d, 1H, *J*=7.6); 9.05 (bs, 1H, NH).

ESI-MS: 359.2 [M+H]⁺.

N-(3-(4-(3,4-diclorofenil)piperazin-1-il)propil)picolinammide (12m)

Da **10b** e 1-(3,4-diclorofenil)piperazina.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.84 (m, 2H, -CH₂-CH₂-CH₂, *J*=5.8); 2.58 (t, 2H, -CH₂-N¹, *J*=5.4); 2.63 (bs, 4H, 2CH₂ pip.); 3.26 (bs, 4H, 2CH₂ pip.); 3.60 (q, 2H, -NH-CH₂, *J*=5.4); 6.76 (d, 1H, *J*=8.8); 6.96 (s, 1H); 7.29 (d, 1H, *J*=8.8); 7.37 (t, 1H, *J*=7.4); 7.82 (t, 1H, *J*=7.6); 8.17 (d, 1H, *J*=7.3); 8.40 (d, 1H, *J*=7.6); 9.02 (bs, 1H, NH).

ESI-MS: 393.1 [M+H]⁺.

N-(3-(4-(2-fluorofenil)piperazin-1-il)propil)picolinammide (12n)

Da **10b** e 1-(2-fluorofenil)piperazina.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.84 (m, 2H, -CH₂-CH₂-CH₂, *J*=5.4); 2.60 (t, 2H, -CH₂-N¹, *J*=5.4); 2.69 (bs, 4H, 2CH₂ pip.); 3.21 (bs, 4H, 2CH₂ pip.); 3.61 (q, 2H, -NH-CH₂, *J*=5.1); 6.95-7.06 (m, 4H); 7.38 (t, 1H, *J*=7.4); 7.83 (t, 1H, *J*=7.6); 8.18 (d, 1H, *J*=7.6); 8.49 (d, 1H, *J*=7.6); 9.05 (bs, 1H, NH).

ESI-MS: 343.4 [M+H]⁺, 365.4 [M+Na]⁺.

N-(3-(4-(4-fluorofenil)piperazin-1-il)propil)picolinammide (12o)

Da **10b** e 1-(4-fluorofenil)piperazina.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.84 (m, 2H, -CH₂-CH₂-CH₂, *J*=5.4); 2.58 (t, 2H, -CH₂-N¹, *J*=5.4); 2.66 (bs, 4H, 2CH₂ pip.); 3.21 (bs, 4H, 2CH₂ pip.); 3.59 (q, 2H, -NH-CH₂, *J*=5.1); 6.90 (d, 2H, *J*=8.0); 6.97 (t, 2H, *J*=8.0); 7.36 (t, 1H, *J*=7.4); 7.81 (t, 1H, *J*=7.6); 8.16 (d, 1H, *J*=7.3); 8.41 (d, 1H, *J*=7.6); 9.03 (bs, 1H, NH).

ESI-MS: 343.4 [M+H]⁺, 365.5 [M+Na]⁺.

N-(3-(4-(piridin-2-il)piperazin-1-il)propil)picolinammide (12p)

Da **10b** e 1-(piridin-2-il)piperazina.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.85 (m, 2H, -CH₂-CH₂-CH₂, *J*=5.4); 2.57 (t, 2H, -CH₂-N¹, *J*=5.4); 2.60 (bs, 4H, 2CH₂ pip.); 3.59 (q, 2H, -NH-CH₂, *J*=5.1); 3.63 (bs, 4H, 2CH₂ pip.); 6.61 (d, 1H, *J*=8.4); 6.63 (t, 1H, *J*=7.3); 6.66 (t, 1H, *J*=7.3); 7.36 (t, 1H, *J*=7.3); 7.48 (t, 1H, *J*=7.6); 7.81 (t, 1H, *J*=7.3); 8.19 (d, 1H, *J*=7.6); 8.43 (d, 1H, *J*=7.6); 9.02 (bs, 1H, NH).

ESI-MS: 326.1 [M+H]⁺, 348.2 [M+Na]⁺.

N-(3-(4-(pirimidin-2-il)piperazin-1-il)propil)picolinammide (12q)

Da **10b** e 1-(pirimidin-2-il)piperazina.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.84 (m, 2H, -CH₂-CH₂-CH₂, *J*=5.4); 2.54 (bs, 4H, 2CH₂ pip.); 2.57 (t, 2H, -CH₂-N¹, *J*=5.4); 3.60 (q, 2H, -NH-CH₂, *J*=5.4); 3.91 (bs, 4H, 2CH₂ pip.); 6.47 (t, 1H, *J*=8.1); 7.37 (t, 1H, *J*=7.3); 7.82 (t, 1H, *J*=7.3); 8.17 (d, 1H, *J*=7.6); 8.29 (d, 2H, *J*=7.0); 8.48 (d, 1H, *J*=7.6); 9.02 (bs, 1H, NH).

ESI-MS: 327.2 [M+H]⁺.

N-(3-(4-(piperonil)piperazin-1-il)propil)picolinammide (12r)

Da **10b** e 1-(piperonil)piperazina.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.80 (bs, 6H); 2.52 (bs, 6H); 3.45 (s, 2H, -CH₂-); 3.55 (q, 2H, -NH-CH₂, *J*=5.4); 5.93 (s, 2H, -OCH₂); 6.72 (bs, 2H); 6.85 (s, 1H); 7.82 (t, 1H, *J*=7.3); 8.16 (d, 1H, *J*=7.6); 8.49 (d, 1H, *J*=7.3); 8.86 (bs, 1H, NH).

ESI-MS: 383.0 [M+H]⁺.

N-(3-(4-(furoil)piperazin-1-il)propil)picolinammide (12s)

Da **10b** e 1-(furoil)piperazina.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.82 (qt, 2H, -CH₂-CH₂-CH₂, *J*=5.4); 2.59 (bs, 6H); 3.58 (q, 2H, NH-CH₂, *J*=5.4); 3.90 (bs, 4H, 2CH₂ pip.); 6.47 (d, 1H, *J*=7.3); 6.99 (d, 1H, *J*=7.6); 7.41 (t, 1H, *J*=7.3); 7.46 (t, 1H, *J*=7.6); 7.83 (t, 1H, *J*=7.6); 8.18 (d, 1H, *J*=7.9); 8.52 (d, 1H, *J*=7.3); 8.99 (bs, 1H, NH).

ESI-MS: 343.3 [M+H]⁺, 365.2 [M+Na]⁺, 381.2 [M+K]⁺.

N-(3-(4-(4-clorobenzidril)piperazin-1-il)propil)picolinammide (12t)

Da **10b** e 1-(4-clorobenzidril)piperazina.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.80 (m, 2H, -CH₂-CH₂-CH₂, *J*=5.4); 2.51 (bs, 4H, 2CH₂ pip.); 2.54 (bs, 6H); 3.53 (q, 2H, -NH-CH₂, *J*=5.1); 4.25 (s, 1H, -CH-); 7.19 (t, 1H, *J*=7.3); 7.21-7.27 (m, 4H); 7.34-7.37 (m, 4H); 7.42 (t, 1H, *J*=7.6); 7.82 (t, 1H, *J*=7.6); 8.15 (d, 1H, *J*=7.9); 8.43 (d, 1H, *J*=7.3); 8.79 (bs, 1H, NH).

ESI-MS: 449.2 [M+H]⁺, 471.1 [M+Na]⁺.

N-(3-(4-(bis(4-fluorofenil)metil)piperazin-1-il)propil)picolinammide (12u)

Da **10b** e 1-bis(4-fluorofenil)piperazina.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 2.25 (m, 2H, -CH₂-CH₂-CH₂, *J*=5.4); 3.00 (bs, 4H, 2CH₂ pip.); 3.13 (bs, 4H, 2CH₂ pip.); 3.50 (t, 2H, -CH₂-N¹, *J*=5.8); 3.61 (q, 2H, -NH-CH₂, *J*=5.1); 4.53 (s, 1H, -CH-); 7.16 (t, 4H, *J*=8.5); 7.43 (t, 4H, *J*=7.6); 7.46 (t, 1H, *J*=7.6); 7.83 (t, 1H, *J*=7.6); 8.09 (d, 1H, *J*=7.9); 8.39 (bs, 1H, NH); 8.54 (d, 1H, *J*=7.3).

ESI-MS: 451.3 [M+H]⁺.

N-(3-(4-(naft-1-il)piperazin-1-il)propil)picolinammide cloridrato (12v)

Da **10b** e 1-(naft-1-il)piperazina

¹H-NMR (400 MHz, DMSO) δ: 2.20 (m, 2H, -CH₂-CH₂-CH₂, *J*=5.4); 3.38 (t, 4H, 2CH₂ pip., *J*=4.7); 3.51 (t, 2H, -CH₂-N¹, *J*=5.4); 3.62 (t, 4H, 2CH₂ pip., *J*=4.7); 3.73 (q, 2H, -NH-CH₂, *J*=5.4); 7.21 (d, 1H, *J*=7.3); 7.43 (t, 1H, *J*=8.0); 7.50 (m, 2H, *J*=7.3); 7.63 (d, 1H, *J*=8.3); 7.72 (t, 1H, *J*=5.8); 7.85 (d, 1H, *J*=7.3); 8.16 (d, 1H, *J*=8.3); 8.18 (d, 1H, *J*=8.3); 8.25 (t, 1H, *J*=7.6); 8.28 (bs, 1H, NH); 8.71 (d, 1H, *J*=7.0).

ESI-MS: 375.2 [M+H]⁺.

SPERIMENTAZIONE

FARMACOLOGICA

I prodotti sintetizzati sono stati sottoposti a sperimentazione farmacologica presso il Dipartimento di Scienze Mediche, Chirurgiche e Neuroscienze dell'Università di Siena, nei laboratori diretti dalla Prof.ssa Paola Massarelli e presso il Dipartimento di Farmacia dell'Università degli Studi di Napoli "Federico II", nei laboratori dei Proff. Angelo Izzo e Raffaele Capasso.

L'affinità dei composti finali a nucleo N'-cianopicolinamidinico (**4a-q**), isonicotinico (**7a-v** e **8a-v**) e picolinico (**11a-v** e **12a-v**) verso i sottotipi recettoriali serotoninergici 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2C}, D₁, D₂, α_1 e α_2 , è stata valutata mediante saggi di "binding" con radioligandi.

Come ligandi specifici sono stati utilizzati l'[³H]-8-OH-DPAT per i recettori 5-HT_{1A}, la [³H]-ketanserina per i recettori 5-HT_{2A}, la [³H]-mesulergina per i recettori 5-HT_{2C}, l'[³H]SCH-23390 per i recettori D₁, lo [³H]spiperone per i recettori D₂, la [³H]prazosina per i recettori α_1 e la [³H]yohimbina per i recettori α_2 . Tutti i saggi di *binding* sono stati condotti su omogenati di cervello di ratto; in particolare, in tutti i saggi è stato utilizzato come tessuto corteccia cerebrale di ratto, eccetto che per i saggi sui recettori dopaminergici D₁ e D₂, in cui si è utilizzato striato di ratto.

Le concentrazioni richieste per inibire del 50% lo specifico *binding* dei radioligandi (IC₅₀) sono state determinate saggiando ciascun composto in triplo, usando da sei a nove differenti concentrazioni del composto in esame. I valori di IC₅₀ ottenuti sono stati utilizzati per calcolare le costanti apparenti di inibizione (K_i) attraverso il metodo di Cheng e Prusoff [88] basato sulla seguente equazione: $K_i = IC_{50} / (1 + S/K_D)$, dove S rappresenta la concentrazione del radioligando utilizzata e K_D la sua costante di dissociazione recettoriale [89].

I composti più attivi appartenenti alla serie a nucleo N'-cianopicolinamidinico (**4a-q**) ed alla serie a nucleo isonicotinico (**7a-v** e **8a-v**) sono stati selezionati ed è stata valutata la loro affinità sui recettori dopaminergici D₁ e D₂ ed adrenergici α_1 e α_2 . Successivamente, al fine di ottenere una completa caratterizzazione farmacologica, i composti che hanno mostrato un miglior profilo di affinità/selettività della serie a nucleo N'-cianopicolinamidinico e tutti i derivati della serie a nucleo isonicotinico, sono stati valutati in saggi funzionali su ileo di ratto. I derivati picolinici sono invece tuttora sottoposti a valutazione farmacologica ed i dati di *binding*, così come i risultati dell'attività funzionale, non sono disponibili e non saranno quindi oggetto di discussione in questa tesi.

Saggi di binding: 5-HT_{1A}

Per la preparazione dei recettori 5-HT_{1A} è stato impiegato il metodo di Schlegel [90], secondo cui la corteccia cerebrale di ratti maschi Sprague-Dawley è stata omogenata in 20 volumi di tampone freddo Tris-HCl (50 nM, pH 7.7 a 22°C) con un Brinkmann Polytron PT10 (posizionato su 5 per 5 secondi); l'omogenato è stato centrifugato a 50000 giri per 10 minuti a 0°C. Il pellet risultante è stato risospeso nello stesso tampone, incubato per 10 minuti a 37 °C e centrifugato a 50000 giri per 10 minuti. Il pellet finale contenente i recettori è stato risospeso in 80 volumi del tampone Tris-HCl contenente 10 µM di pargilina, 4 mM di CaCl₂ e acido ascorbico allo 0.1%. A ciascuna provetta sono stati aggiunti: 0.1 ml del farmaco diluito (0.1 ml di acqua distillata per la prova in bianco), 0.1ml di [³H]-8-idrossi-2-(di-n-propilammino)-tetralina ([³H]-8-OH-DPAT) in tampone (contenente Tris-HCl, CaCl₂, pargilina e acido ascorbico) per ottenere nel saggio una concentrazione finale di 0.1 nM e 0.8 ml di membrana risospesa. Le provette sono state incubate per 30 minuti a 37°C ed infine filtrate sotto vuoto utilizzando filtri Whatman GF/B. I filtri sono stati lavati per due volte con 5 ml di tampone freddo Tris-HCl. La

radioattività rimasta sul filtro è stata misurata mediante spettrometria a scintillazione liquida. Il legame specifico del [^3H]-8-OH-DPAT è stato determinato come differenza tra il legame in assenza ed in presenza di serotonina (10 μM).

Saggi di binding: 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C}

Per la preparazione dei recettori 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C} è stato impiegato il metodo riportato da Herndon et al [91]. Le regioni della corteccia frontale dei ratti maschi Sprague-Dawley (200-250 g; Charles River) sono state sezionate in ghiaccio, omogenate (1:10 p/v) in una soluzione tampone a 0°C (50 mM Tris-HCl, 0.5 mM di EDTA e 10 mM di MgCl₂, pH 7.4) e centrifugate a 3000 giri per 15 minuti. Il pellet è stato risospeso in tampone (1:30 p/v), incubato a 37°C per 15 minuti e poi ricentrifugato due volte a 3000 giri per 10 minuti. Il pellet finale è stato risospeso in tampone che conteneva anche acido ascorbico allo 0.1% e pargilina 10⁻⁵ M. I saggi sono stati eseguiti in triplo in un volume di 20 ml contenente 5 mg p/p di tessuto e 0.4 nM di [^3H]-ketanserina (76.0 Ci/mmol; New England Nuclear) per i saggi sui recettori 5-HT_{2A}, e 10 mg p/p di tessuto ed 1 nM di [^3H]-mesulergina (75.8 Ci/mmol; Amersham) per i saggi sui recettori 5-HT_{2C}.

Per definire il legame aspecifico nel saggio di *binding* per i recettori 5-HT_{2A} è stata utilizzata la cinanserina (1.0 μM). Nel saggio di *binding* per i recettori 5-HT_{2C} è stata utilizzata la mianserina (1.0 μM) per definire il legame aspecifico aggiungendo a tutte le provette 100 nM di spiperone (Sigma-Aldrich) per ostacolare il legame ai recettori 5-HT_{2A}. Le provette, poi, sono state incubate per 15 minuti a 37 °C, filtrate su filtri Schleicher e Schuell (Keene, NH) in fibra di vetro sinterizzato, in polietilenimmina e lavati con 10 ml di una soluzione di tampone fredda. I filtri sono stati misurati con efficienza del 50%.

Saggi di binding: D₁

Per la preparazione dei recettori D₁ è stato impiegato il metodo descritto da Billard et al. [92]. I corpi striati sono stati omogenati in 30 vol (w/v) di tampone freddo Tris-HCl 50 mM (pH 7.7 a 25 °C) con un Polytron PT10 (posizionato su 5 per 20 s). Gli omogenati sono stati centrifugati a 50000 giri per 10 minuti. Il pellet risultante è stato risospeso in tampone freddo Tris-HCl 50 mM (pH 7.7 a 37 °C) contenente 120 mM di NaCl, 5 mM KCl, 2 mM di CaCl₂, 1 mM di MgCl₂, 0.1% di acido ascorbico e 10 µM di pargilina. Ciascuna provetta conteneva 50 µl di [³H]SCH-23390 (85.0 Ci/mmol, Perkin Elmer Life Sciences, Boston, MA, USA) per ottenere una concentrazione finale di 0.4 nM e 900 µl di membrane sospese (3 mg di tessuto fresco). Le provette sono state incubate per 15 minuti a 37°C ed infine filtrate sotto vuoto utilizzando filtri Whatman GF/B. I filtri sono stati lavati per due volte con 5 ml di tampone freddo Tris-HCl (pH 7.7 a 25°C). La radioattività rimasta sul filtro è stata misurata mediante spettrometria a scintillazione liquida. Il legame specifico del [³H]SCH-23390 è stato determinato come differenza tra il legame in assenza ed in presenza del piflutixolo 0.1 µM.

Saggio di binding: D₂

Per la preparazione dei recettori D₂ è stato impiegato il metodo di Creese et al. [93]. I corpi striati sono stati omogenati in 30 vol (w/v) di tampone freddo Tris-HCl 50 mM (pH 7.7 a 25°C) con un Polytron PT10 (posizionato su 5 per 20 s). Gli omogenati sono stati centrifugati due volte a 50000 giri per 10 minuti. Il pellet risultante è stato risospeso in tampone freddo Tris-HCl 50 mM (pH 7.1 a 37°C) contenente 120 mM di NaCl, 5 mM KCl, 2 mM di CaCl₂, 1 mM di MgCl₂, 0.1% di acido ascorbico e 10 µM di pargilina. Ciascuna provetta conteneva 50 µl di [³H]-spiperone (15.7 Ci/mmol, Perkin Elmer Life

Sciences, Boston, MA, USA) per ottenere una concentrazione finale di 0.4 nM e 900 μ l di membrane sospese (3 mg di tessuto fresco). Le provette sono state incubate per 15 minuti a 37°C ed infine filtrate sotto vuoto utilizzando filtri Whatman GF/B. I filtri sono stati lavati in tre tempi con 5 ml di tampone freddo Tris-HCl (pH 7.7 a 25°C). La radioattività rimasta sul filtro è stata misurata mediante spettrometria a scintillazione liquida. Il legame specifico dello [3 H]spiperone è stato determinato come differenza tra il legame in assenza ed in presenza del (+)-butaclamol 1.0 μ M.

Saggio di binding: α_1

La procedura utilizzata in tali saggi sui recettori α_1 è stata riportata in dettaglio da Greengrass e Bremner [94]. La corteccia cerebrale è stata omogenata in 30 vol (w/v) di tampone freddo Tris-HCl 50 mM (pH 7.2 a 25°C) con un Polytron PT10 (posizionato su 5 per 20 s). Gli omogenati sono stati centrifugati in due volte a 50000 giri per 10 minuti. Il pellet risultante è stato risospeso in tampone freddo Tris-HCl 50 mM (pH 7.4 a 25°C). Ciascuna provetta conteneva 50 μ l di soluzione fisiologica, 50 μ l di [3 H]-prazosina (80.5 Ci/mmol, Perkin Elmer Life Sciences, Boston, MA, USA) per ottenere una concentrazione finale di 0.4 nM e 900 μ l di membrane sospese (10 mg di tessuto fresco). Le provette sono state incubate per 15 minuti a 25°C ed infine filtrate sotto vuoto utilizzando filtri Whatman GF/B. I filtri sono stati lavati in tre tempi con 5 ml di tampone freddo Tris-HCl (pH 7.2 a 25°C). La radioattività rimasta sul filtro è stata misurata mediante spettrometria a scintillazione liquida. Il legame specifico della [3 H]prazosina è stato determinato come differenza tra il legame in assenza ed in presenza della fentolamina 10 μ M.

Saggio di binding: α_2

Per la preparazione dei recettori α_2 è stato impiegato il metodo di Perry e U'Prichard [95]. La corteccia cerebrale è stata omogenata in 30 vol (w/v) di tampone freddo Tris-HCl 5 mM e 5 mM di EDTA (pH 7.7 a 25°C) con un Polytron PT10 (posizionato su 5 per 20 s). Gli omogenati sono stati centrifugati in due volte a 50000 giri per 10 minuti. Il pellet risultante è stato risospeso in tampone freddo Tris-HCl 50 mM e 0.5 mM di EDTA (pH 7.5 a 25°C). Ciascuna provetta conteneva 50 μ l di soluzione fisiologica, 50 μ l di [3 H]-yohimbina (80.5 Ci/mmol, Perkin Elmer Life Sciences, Boston, MA, USA) per ottenere una concentrazione finale di 1.0 nM e 900 μ l di membrane sospese (10 mg di tessuto fresco). Le provette sono state incubate per 30 minuti a 25°C ed infine filtrate sotto vuoto utilizzando filtri Whatman GF/B. I filtri sono stati lavati in tre tempi con 5 ml di tampone freddo Tris-HCl 50 mM e 0.5 mM di EDTA (pH 7.5 a 25°C). La radioattività rimasta sul filtro è stata misurata mediante spettrometria a scintillazione liquida. Il legame specifico della [3 H]-yohimbina è stato determinato come differenza tra il legame in assenza ed in presenza della fentolamina 10 μ M.

Saggio funzionale su ileo di ratto

Sono stati utilizzati ratti di sesso maschile di ceppo Wistar (200-220g) forniti dalla ditta Harlan Italy, conservati alle seguenti condizioni di stabulazione: temperatura $20 \pm 2^\circ\text{C}$, umidità $58 \pm 2\%$, cicli di luce-buio di 12 ore. Gli animali sono stati alimentati con una dieta standard fornita dalla ditta Arvel Italia Bruscianno (NA). Ai ratti sacrificati in un'atmosfera satura di anidride carbonica, è stato prelevato l'ileo 5-7 cm a monte della valvola ileo cecale; l'ileo è stato ripulito del suo contenuto e posto in una soluzione di Krebs a

temperatura ambiente e ossigenata con una miscela di O₂ al 95% e CO₂ al 5%. La composizione della soluzione di Krebs (espressa in mM) è la seguente: NaCl 119; KCl 4.75; KH₂PO₄ 12; NaHCO₃ 25; MgSO₄ 1.5; CaCl₂ 2.5; Glucosio 1.1.

Dopo la dissezione, i segmenti di ileo sono stati montati in un bagno per organi isolati di 20 ml contenenti soluzioni di Krebs carbogenate (O₂ al 95% e CO₂ al 5%) e termoregolate a 37°C. L'attività meccanica delle fibre longitudinali è stata registrata mediante un trasduttore isotonico (peso 0.5 g) collegato ad un sistema di registrazione elettronico computerizzato (Sistema PowerLab). L'attività meccanica delle fibre longitudinali è stata registrata dopo un periodo di stabilizzazione del tessuto (1 ora circa). I segmenti di muscolatura liscia isolati *in vitro* venivano stimolati con serotonina alla concentrazione di 10⁻⁵ M. Infatti, tale concentrazione risultava idonea a determinare almeno tre risposte contrattili uguali (contrazioni di controllo). La serotonina veniva aggiunta al bagnetto e lasciata a contatto con il tessuto per 60 sec. Dopo la registrazione delle contrazioni, il tessuto era lavato con la soluzione di Krebs. L'intervallo di tempo tra le varie somministrazioni era di 15 minuti. Dopo almeno tre contrazioni di controllo (contrazioni di altezza simile), la risposta contrattile era osservata in presenza dei ligandi serotoninergici sintetizzati.

Tutti i composti sono stati solubilizzati in DMSO e aggiunti nel bagnetto in volume inferiore allo 0.01% del volume del bagnetto. Il DMSO, utilizzato alla concentrazione dello 0.01%, non ha mostrato alcun effetto sulle contrazioni indotte da serotonina.

RISULTATI E DISCUSSIONE

DERIVATI A NUCLEO N'-CIANOPICOLINAMIDINICO (4a-q)

I valori di affinità dei composti sintetizzati (**4a-q**) verso i vari sottotipi recettoriali 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C}, valutati mediante saggi di *binding* con radioligandi ed espressi come valori di costanti di inibizione K_i (nM), sono riportati in Tabella 8.

Dall'analisi dei risultati ottenuti emerge un dato molto interessante: l'introduzione del nucleo N'-cianopicolinamidinico, in sostituzione del nucleo N'-cianoisonicotinamidinico, precedentemente utilizzato come *scaffold* per la sintesi di nuovi ligandi serotoninergici [84], ha determinato, per la maggior parte dei nuovi composti, uno spostamento del profilo di affinità dal recettore 5-HT_{1A} verso il sottotipo recettoriale 5-HT_{2A}. In particolare, i derivati *o*-OCH₃-fenilpiperazinico (**4d**, K_i=0.00157 nM), *m*-Cl-fenilpiperazinico (**4l**, K_i=0.000185 nM), *m*-CF₃-fenilpiperazinico (**4m**, K_i=0.000778 nM) e pirimidilpiperazinico (**4n**, K_i=0.0161 nM) hanno mostrato non solo un ottimo profilo di affinità verso il sottotipo recettoriale 5-HT_{2A}, ma anche una considerevole selettività dal momento che i loro valori di K_i risultano 100000 (per **4n**), 30000 (per **4l**) e 1000 (per **4d** e **4m**) volte minori rispetto ai valori di K_i esibiti per i recettori 5-HT_{1A} e 5-HT_{2C}. La maggiore affinità dei derivati *m*-Cl-fenilpiperazinico (**4l**) e *m*-CF₃-fenilpiperazinico (**4m**) nei confronti del sottotipo recettoriale 5-HT_{2A} può essere dovuta alla loro maggiore lipofilia, come già riportato in letteratura [96], così come l'interessante profilo dei derivati *o*-OCH₃-fenilpiperazinico(**4d**), pirimidilpiperazinico (**4n**) e piridilpiperazinico (**4o**) può essere dovuto alla presenza dell'atomo di ossigeno (nel caso di **4d**) e dell'atomo di azoto (per i composti **4n** e **4o**) che fungono da accettori di legami a idrogeno con i residui di Thr-201 o Ser-203 presenti nella quarta elica transmembranaria e con i residui di Ser-239, Ser-241, Thr-248 o Thr-253 presenti nella quinta elica transmembranaria della controparte recettoriale [97].

Tabella 8. Valori di affinità K_i (nM) dei composti a nucleo N'-cianopicolinamidinico (**4a-q**) per i recettori 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C}.

Affinità recettoriale ^a $K_i \pm SD$ (nM)				
Comp.	X	5-HT _{1A} [³ H]8OH-DPAT	5-HT _{2A} [³ H]Ketanserina	5-HT _{2C} [³ H]Mesulergina
4a		>10 ⁴	>10 ⁴	>10 ⁴
4b		>10 ⁴	>10 ⁴	389 ± 17.7
4c		>10 ⁴	>10 ⁴	597 ± 8.8
4d		4.68 ± 0.389	0.00157 ± 0.000106	1.61 ± 0.458
4e		0.0842 ± 0.00088	>10 ⁴	>10 ⁴
4f		17.2 ± 1.36	2730 ± 143	>10 ⁴
4g		>10 ⁴	904 ± 10.2	28.8 ± 2.67
4h		30 ± 1.79	0.867 ± 0.0308	29.7 ± 2.14
4i		170 ± 11.7	27 ± 0.97	>10 ⁴
4l		6.67 ± 0.070	0.000185 ± 0.000016	3.28 ± 0.223
4m		1.31 ± 0.263	0.000778 ± 0.000033	1.81 ± 0.178
4n		3080 ± 154	0.0161 ± 0.00120	22.5 ± 1.74
4o		30.6 ± 2.20	1.12 ± 0.178	>10 ⁴
4p		>10 ⁴	51.8 ± 0.27	>10 ⁴
4q		>10 ⁴	21.5 ± 0.21	>10 ⁴

^aValori di K_i (nM) seguiti da SD. Nelle stesse condizioni, l'8-OH-DPAT, la Ketanserina e la Mesulergina, presi come termine di confronto, si legano rispettivamente ai recettori 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C} con valori di K_i di 0.80, 0.85 e 1.90 nM.

In questa nuova serie di derivati a nucleo N'-cianopicolinamidinico l'unico composto che si è dimostrato maggiormente affine e selettivo verso il recettore 5-HT_{1A} è risultato il derivato **4e** (K_i=0.0842 nM) supportante un residuo *p*-OCH₃-fenilpiperazinico. Anche questo dato risulta totalmente nuovo nel campo dello studio dei ligandi serotoninergici, in quanto la sostituzione in posizione *para* del residuo arilpiperazinico solitamente sfavorisce il legame verso il sottotipo recettoriale 5-HT_{1A}. Tale dato, apparentemente in contraddizione con le precedenti serie di ligandi serotoninergici sintetizzate dal gruppo di ricerca presso cui ho svolto la mia attività di dottorato [76-84], può essere ascritto alla presenza dell'atomo di azoto in posizione -2 del nucleo piridinico che, creando interazioni addizionali con il recettore, favorirebbe, come già dimostrato, una migliore accomodazione del ligando all'interno del sito di *binding* recettoriale, determinandone così una distanza utile alla formazione di un legame a idrogeno supplementare del residuo metossilico in posizione *para* con il residuo di Asn-386 [78,80,82].

Infine, appare evidente come l'utilizzo di un residuo alifatico in posizione 4 dell'anello piperazinico (**4a**, **4b**, **4c**) in luogo di un qualsiasi residuo aromatico determini una brusca perdita di affinità verso i sottotipi recettoriali in esame, in quanto solo i derivati **4b** e **4c** hanno dimostrato una minima affinità nei confronti del sottotipo recettoriale 5-HT_{2C}, ma comunque di gran lunga inferiore a quella mostrata dagli altri derivati nei confronti degli altri sottotipi recettoriali.

Sulla base dei risultati farmacologici ottenuti per i derivati a nucleo N'-cianopicolinamidinico è possibile elaborare alcune preliminari relazioni struttura-attività. La migliore affinità per il sottotipo recettoriale 5-HT_{2A} può essere spiegata considerando la topografia del sito di legame del recettore. Infatti, studi di *molecular modeling*, insieme a

dettagliati studi di mutagenesi sito-specifica, hanno suggerito la presenza di una tasca idrofobica, che circonda i ligandi, costituita da residui di aminoacidi aromatici come il Trp-151, Phe-243, Phe-244, Trp-336, Phe-339, Phe-340, Trp-367 e Tyr-370. Inoltre le porzioni polari dei ligandi possono interagire con i residui di Ser-159, Thr-160, Ser-239, Ser-242 e Asn-343, presenti nel sito di legame del recettore 5-HT_{2A}. Infine, le funzioni amminiche protonate, così come si presenta l'azoto dell'anello piperazinico in condizioni fisiologiche, formano interazioni elettrostatiche con un residuo altamente conservato di Asp-155, presente nella terza elica transmembranaria.

Inoltre, confrontando i risultati ottenuti dai saggi di *binding* recettoriale dei derivati **4a-q** a nucleo N'-cianopicolinamidinico con quelli ottenuti dalla precedente serie di derivati a nucleo N'-cianoisonicotinamidinico [84], sembrerebbe che la diversa posizione dell'atomo di azoto all'interno del nucleo piridinico sia determinante per il profilo di affinità/selettività delle molecole sintetizzate. È possibile ipotizzare che così come l'NH indolico della serotonina forma un legame a idrogeno con la catena laterale del residuo di Ser-159 presente nella terza elica transmembranaria del recettore 5-HT_{2A} [98], il doppietto elettronico dell'atomo di azoto piridinico presente nel nucleo N'-cianopicolinamidinico possa formare un legame a idrogeno con lo stesso residuo aminoacidico. Il sottotipo recettoriale 5-HT_{1A}, invece, presenta un residuo di Leu in posizione 159 della sua sequenza amminoacidica, che ovviamente non può fornire alcun legame a idrogeno. Pertanto è possibile affermare che la differente posizione dell'atomo di azoto nel sistema aromatico dei nuclei N'-cianopicolinamidinico e N'-cianoisonicotinamidinico determini la diversa tendenza a formare legami a idrogeno con le controparti recettoriali ed il conseguente differente profilo di affinità e selettività dei derivati N'-cianopicolinamidinici verso il recettore 5-HT_{2A} e dei derivati N'-cianoisonicotinamidinici verso il recettore 5-HT_{1A} [85].

Infine, i derivati che hanno mostrato i migliori profili di affinità/selettività verso i recettori serotoninergici sono stati selezionati e sottoposti ad ulteriori saggi di *binding* sui recettori dopaminergici D₁ e D₂ e adrenergici α_1 e α_2 , al fine di valutare il completo profilo di selettività farmacologica, necessario ai fini di un potenziale utilizzo terapeutico. Infatti, i risultati ottenuti mostrano come tutti i composti in esame siano risultati scarsamente affini nei confronti dei recettori dopaminergici ed adrenergici, confermando quindi una spiccata selettività nei confronti dei recettori serotoninergici (Tabella 9).

Tabella 9. Valori di affinità K_i (nM) dei derivati N'-cianopicolinamidinici (**4d**, **4e**, **4f**, **4h**, **4l**, **4m**, **4n**, **4o**, **4p**, **4q**) per i recettori D₁, D₂, α_1 e α_2 .

Comp.	K _i ± SD (nM)			
	α_1 [³ H]Prazosina	α_2 [³ H]Ioimbina	D ₁ [³ H]SCH-23390	D ₂ [³ H]Spiperone
4d	105 ± 28	245 ± 38	>10 ⁴	>10 ⁴
4e	>10 ⁴	>10 ⁴	>10 ⁴	>10 ⁴
4f	152 ± 7	571 ± 38	52.4 ± 3.6	>10 ⁴
4h	729 ± 9	318 ± 8	>10 ⁴	>10 ⁴
4l	174 ± 19	1360 ± 77	381 ± 33	>10 ⁴
4m	770 ± 16	>10 ⁴	>10 ⁴	83.7 ± 3.2
4n	>10 ⁴	>10 ⁴	>10 ⁴	>10 ⁴
4o	130 ± 12	>10 ⁴	>10 ⁴	>10 ⁴
4p	>10 ⁴	964 ± 67	>10 ⁴	>10 ⁴
4q	>10 ⁴	>10 ⁴	>10 ⁴	>10 ⁴

DERIVATI A NUCLEO ISONICOTINICO (7a-v e 8a-v)

I valori di affinità dei composti sintetizzati (**7a-v** e **8a-v**) verso i sottotipi recettoriali 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C}, valutati mediante saggi di *binding* con radioligandi ed espressi come valori di costanti di inibizione K_i (nM) sono riportati in Tabella 10 ed in Tabella 11.

L'introduzione dell'anello isonicotinico, semplificazione molecolare del nucleo N'-cianoisonicotinamidinico, ha determinato una minore selettività della serie di composti sintetizzata verso il sottotipo recettoriale 5-HT_{1A}. Come già anticipato, infatti, i derivati a nucleo N'-cianoisonicotinamidinico, precedentemente sintetizzati, mostravano un profilo di affinità e selettività preferenziale verso il sottotipo recettoriale 5-HT_{1A} [84]. In questa nuova serie di derivati, invece, sono state ottenute alcune molecole che hanno dimostrato un profilo di affinità e selettività verso il sottotipo recettoriale 5-HT_{1A} (**7p**, **8c**, **8g**, **8p**, **8u**), altre caratterizzate da un profilo di affinità/selettività verso il sottotipo recettoriale 5-HT_{2A} (**7m**, **7n**, **7o**, **7u**, **8b**, **8l**, **8m**, **8n**, **8o** e **8q**) e molecole caratterizzate da un profilo di affinità mista 5-HT_{1A} e 5-HT_{2C} (**7b**, **7h** e **8r**). Il differente profilo delle molecole sintetizzate può essere ascrivito alle differenti caratteristiche steriche, di lipofilia e di densità elettronica dei sostituenti legati all'anello piperazinico. Infatti all'interno della serie caratterizzata dalla presenza di un *linker* etilenico (n=2) tra il nucleo isonicotinico e l'anello piperazinico, appare evidente come la presenza di un sostituyente poco ingombrato favorisca l'interazione con il sottotipo recettoriale 5-HT_{1A}, come nel caso dei derivati supportanti un residuo fenilpiperazinico **7a** (K_i=8.74 nM) o 2,3-dimetilfenilpiperazinico **7g** (K_i=16.7 nM). Tale interazione risulta ancora maggiore se il sostituyente stesso può fungere da accettore di legami a idrogeno, come nel caso dei derivati supportanti un residuo *o*-metossifenilpiperazinico **7b** (K_i=0.36 nM), *o*-etossifenilpiperazinico **7d** (K_i=4.77 nM) o piridinilpiperazinico **7p** (K_i=1.08 nM). Tale evidenza trova conferma nei dati riportati in

letteratura, in quanto al fine di ottenere la migliore interazione recettoriale è necessaria la presenza di una funzione amminica protonata (l'atomo di azoto dell'anello piperazinico) che possa interagire con un residuo altamente conservato di Asp-116, presente nella terza elica transmembranaria [99] e di un gruppo accettore di legami a idrogeno che possa fornire un ulteriore legame a idrogeno con un residuo di Asn-386 [78,80,82]. Alla luce dei risultati di *binding* dei composti **7c**, **7l**, **7m**, **7o** è possibile inoltre confermare quanto precedentemente riportato in letteratura [100], ovvero che la presenza di un sostituito in posizione *para* di un residuo fenilpiperazinico rende estremamente sfavorevole l'interazione con il recettore 5-HT_{1A}, a causa delle avverse interazioni steriche che intervengono tra il sostituito in posizione *para* e il residuo di Trp-358 e/o il backbone dell'elica TM6 del recettore.

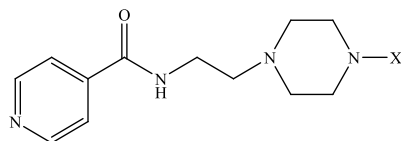
All'interno della serie (**8a-v**) con un *linker* propilenico (n=3), alcune considerazioni restano ancora valide, come ad esempio la migliore affinità dei derivati supportanti un residuo *o*-etossifenilpiperazinico (**8d**, K_i=9.59 nM) o piridinilpiperazinico (**8p**, K_i=8.74nM), capaci di instaurare legami a idrogeno con la controparte recettoriale. Ciononostante è da sottolineare come risultino affini verso il sottotipo recettoriale 5-HT_{1A} anche i composti **8c** (K_i=24.7 nM) supportante un residuo *p*-metossifenilpiperazinico e **8r** (K_i=0.0113 nM) supportante un residuo piperonilpiperazinico. Tale evidenza risulta in accordo con i dati sperimentali riportati in letteratura, secondo cui, in presenza di uno *spacer* alchilico di lunghezza maggiore, il sito recettoriale permette l'accomodamento anche di residui fenilpiperazini *para*-sostituiti o di sostituenti stericamente ingombrati [101,102].

Per quanto riguarda il profilo di affinità e selettività dei composti sintetizzati nei confronti del sottotipo recettoriale 5-HT_{2A} è possibile evidenziare che anche in questa serie

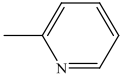
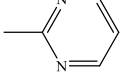
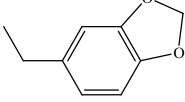
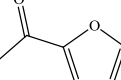
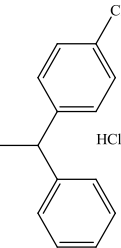
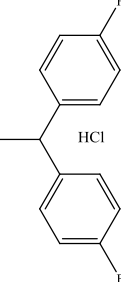
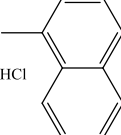
di derivati, così come è già avvenuto per i derivati a nucleo N'-cianopicolinamidinico, il fattore maggiormente discriminante sembra essere la lipofilia del composto stesso. Infatti, l'utilizzo di un sostituito maggiormente lipofilo, determina, in linea generale, uno spostamento del profilo di affinità/selettività verso il sottotipo recettoriale 5-HT_{2A}. Molto interessante è inoltre il profilo dei derivati **7m**, **7n**, **7o**, **7t**, **7u**, **8l**, **8m**, **8n** e **8o**, tutti supportanti un sostituito arilico alogenato: tali derivati si sono dimostrati altamente affini al sottotipo recettoriale 5-HT_{2A}. In particolar modo, i derivati fluorurati **7n** (K_i=0.0126nM), **7o** (K_i=0.046 nM), **7u** (K_i=0.00956 nM) e **8n** (K_i=0.039 nM) si sono dimostrati anche altamente selettivi verso tale sottotipo recettoriale, esibendo una costante di inibizione recettoriale almeno 1000 volte inferiore rispetto a quella mostrata nei confronti degli altri due sottotipi recettoriali in esame.

Inoltre, i risultati di *binding* evidenziano come anche la densità elettronica sull'anello aromatico legato all'anello piperazinico possa influenzare l'affinità recettoriale: sostituenti elettrondonatori sull'anello fenilico aumentano l'affinità verso il sottotipo recettoriale 5-HT_{1A}, mentre sostituenti elettronattrattori spostano il profilo di affinità verso il sottotipo recettoriale 5-HT_{2A}. Per quanto riguarda lo *spacer* alchilico tra il nucleo isonicotinico e quello arilpiperazinico, la presenza di un *linker* etilenico sembra favorire l'interazione con il sottotipo recettoriale 5-HT_{2C}, laddove invece il *linker* propilenico ha prodotto composti sempre non affini o non selettivi verso questo sottotipo recettoriale.

Tabella 10. Valori di affinità K_i (nM) dei composti a nucleo isonicotinico (**7a-v**) verso i recettori 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C}.

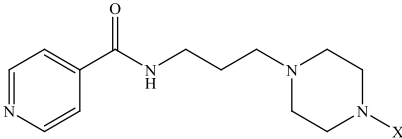


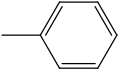
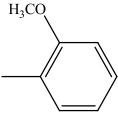
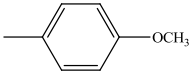
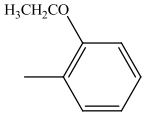
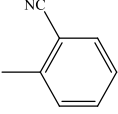
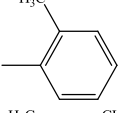
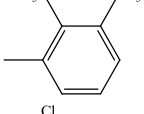
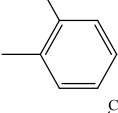
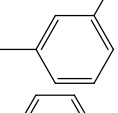
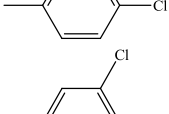
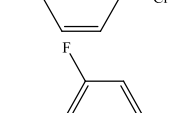
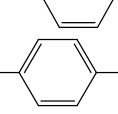

Comp.	X	Affinità recettoriale ^a $K_i \pm SD$ (nM)		
		5-HT _{1A} [³ H]8OH-DPAT	5-HT _{2A} [³ H]Ketanserina	5-HT _{2C} [³ H]Mesulergina
7a		8.74 ± 0.04	199 ± 13	>10 ⁴
7b		0.36 ± 0.01	587 ± 20	0.933 ± 0.010
7c		1270 ± 217	911 ± 16	1330 ± 127
7d		4.77 ± 0.04	16.2 ± 4.6	5.10 ± 0.17
7e		15.2 ± 1.5	54.6 ± 4.0	>10 ⁴
7f		549 ± 41	631 ± 8	>10 ⁴
7g		16.7 ± 1.3	70.7 ± 1.1	2.23 ± 0.21
7h		2.85 ± 0.08	469 ± 14	6.79 ± 0.14
7i		0.82 ± 0.02	35.5 ± 3.8	0.156 ± 0.016
7l		334 ± 28	664 ± 51	>10 ⁴
7m		455 ± 31	9.85 ± 0.67	>10 ⁴
7n		10.6 ± 1.6	0.0126 ± 0.007	100 ± 8
7o		549 ± 13	0.046 ± 0.002	>10 ⁴

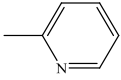
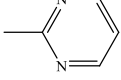
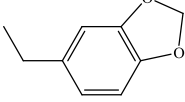
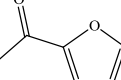
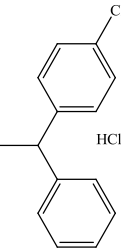
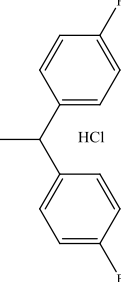
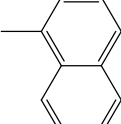
7p		1.08 ± 0.122	$>10^4$	$>10^4$
7q		157 ± 2	2770 ± 410	$>10^4$
7r		36.2 ± 1.4	0.793 ± 0.025	$>10^4$
7s		72.5 ± 2.7	3660 ± 451	331 ± 27
7t		0.658 ± 0.013	6.90 ± 0.26	55.0 ± 1.0
7u		10.0 ± 1.8	0.00956 ± 0.00028	28.7 ± 2.6
7v		5.23 ± 0.02	41.8 ± 3.7	385 ± 14

^aValori di K_i (nM) seguiti da SD. Nelle stesse condizioni, l'8-OH-DPAT, la Ketanserina e la Mesulergina, presi come termine di confronto, si legano rispettivamente ai recettori 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C} con valori di K_i di 0.80, 0.85 e 1.90 nM.

Tabella 11. Valori di affinità K_i (nM) dei composti a nucleo isonicotinico (**8a-v**) verso i recettori 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C}.



Comp.	X	Affinità recettoriale ^a $K_i \pm SD$ (nM)		
		5-HT _{1A} [³ H]8OH-DPAT	5-HT _{2A} [³ H]Ketanserina	5-HT _{2C} [³ H]Mesulergina
8a		56.7 ± 0.4	112 ± 46	29.8 ± 1.0
8b		13.9 ± 3.0	0.254 ± 0.030	>10 ⁴
8c		24.7 ± 1.0	1260 ± 130	>10 ⁴
8d		9.59 ± 0.125	207 ± 13	>10 ⁴
8e		122 ± 17	182 ± 46	191 ± 45
8f		3310 ± 123	>10 ⁴	>10 ⁴
8g		8.42 ± 0.05	770 ± 35	>10 ⁴
8h		124 ± 25	92.6 ± 4.4	>10 ⁴
8i		590 ± 24	1380 ± 141	>10 ⁴
8l		325 ± 29	3.53 ± 0.47	>10 ⁴
8m		219 ± 6.3	1.07 ± 0.08	>10 ⁴
8n		331 ± 12	0.039 ± 0.003	21.2 ± 0.5
8o		99.1 ± 1.5	0.228 ± 0.003	>10 ⁴

8p		8.74 ± 0.04	792 ± 13	$>10^4$
8q		9.19 ± 0.05	0.00985 ± 0.00067	$>10^4$
8r		0.0113 ± 0.0039	$>10^4$	2.19 ± 0.04
8s		779 ± 31	131 ± 21	3080 ± 496
8t		$>10^4$	$>10^4$	$>10^4$
8u		0.130 ± 0.007	$>10^4$	$>10^4$
8v		1060 ± 156	$>10^4$	$>10^4$

^aValori di K_i (nM) seguiti da SD. Nelle stesse condizioni, l'8-OH-DPAT, la Ketanserina e la Mesulergina, presi come termine di confronto, si legano rispettivamente ai recettori 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C} con valori di K_i di 0.80, 0.85 e 1.90 nM.

Anche per questa serie di derivati, i composti che hanno mostrato i migliori profili di affinità/selettività verso i recettori serotoninergici sono stati selezionati e sottoposti ad ulteriori saggi di *binding* sui recettori dopaminergici D₁ e D₂ e adrenergici α_1 e α_2 . I risultati evidenziano che i composti selezionati mostrano scarsa o nulla affinità nei confronti dei recettori dopaminergici ed adrenergici, confermando, anche in questa serie di ligandi, una buona selettività nei confronti dei recettori serotoninergici. In particolare, l'unico derivato che si è dimostrato minimamente affine al solo recettore α_1 risulta essere

7d ($K_i=31.7$ nM), supportante un residuo *o*-etossifenilpiperazinico: tale evidenza trova conferma nell'analisi dei dati riportati in letteratura, in quanto è stato ampiamente descritto che un sostituito alcossialchilico ingombrato sull'anello arilpiperazinico favorisce il legame con il sottotipo recettoriale α_1 . I risultati di *binding* così ottenuti sono riportati in tabella 12.

Tabella 12. Valori di affinità K_i (nM) dei derivati a nucleo isonicotinico (**7a**, **7b**, **7d**, **7g**, **7h**, **7i**, **7m**, **7n**, **7o**, **7p**, **7u**, **8b**, **8d**, **8g**, **8l**, **8m**, **8n**, **8o**, **8q**, **8r**, **8u**) per i recettori D_1 , D_2 , α_1 e α_2 .

Comp.	$K_i \pm SD$ (nM)			
	α_1 [³ H]Prazosina	α_2 [³ H]Ioimbina	D_1 [³ H]SCH-23390	D_2 [³ H]Spiperone
7a	225 ± 16	721 ± 38	>10 ⁴	>10 ⁴
7b	53.0 ± 1.0	828 ± 15	>10 ⁴	537 ± 5
7d	31.7 ± 3.5	778 ± 50	>10 ⁴	263 ± 5
7g	229 ± 9	1300 ± 318	>10 ⁴	>10 ⁴
7h	78.8 ± 0.6	1120 ± 265	>10 ⁴	>10 ⁴
7i	299 ± 27	>10 ⁴	>10 ⁴	>10 ⁴
7m	109 ± 12	213 ± 45	1480 ± 180	>10 ⁴
7n	262 ± 12	615 ± 8	1145 ± 34	652 ± 25
7o	659 ± 41	867 ± 22	1214 ± 17	>10 ⁴
7p	1880 ± 250	>10 ⁴	>10 ⁴	>10 ⁴
7u	>10 ⁴	>10 ⁴	>10 ⁴	>10 ⁴
8b	142 ± 6	857 ± 27	>10 ⁴	>10 ⁴
8d	976 ± 35	>10 ⁴	>10 ⁴	>10 ⁴
8g	67.6 ± 3.3	170 ± 21	>10 ⁴	>10 ⁴
8l	894 ± 6	413 ± 53	>10 ⁴	>10 ⁴
8m	110 ± 40	202 ± 43	1290 ± 201	>10 ⁴
8n	105 ± 5	385 ± 15	>10 ⁴	>10 ⁴
8o	274 ± 25	747 ± 63	>10 ⁴	>10 ⁴
8q	72.9 ± 3.2	1063 ± 145	>10 ⁴	>10 ⁴
8r	1454 ± 352	1522 ± 150	>10 ⁴	>10 ⁴
8u	>10 ⁴	>10 ⁴	>10 ⁴	>10 ⁴

SAGGI FUNZIONALI SU ILEO DI RATTO

Al fine di ottenere una completa caratterizzazione farmacologica, i composti che hanno mostrato un miglior profilo di affinità/selettività verso il sottotipo recettoriale 5-HT_{2A} della serie a nucleo N'-cianopicolinamidinico e tutti i derivati della serie a nucleo isonicotinico sono stati selezionati e sottoposti a saggi funzionali su ileo di ratto. Infatti, come ampiamente riportato in letteratura, a livello enterico, il sottotipo recettoriale 5-HT_{2A} media il rilascio di inositoltrifosfato (IP₃), con conseguente contrazione delle cellule circolari e longitudinali della muscolatura liscia intestinale, che può essere inibita dalla ketanserina, noto antagonista 5-HT_{2A} [103].

Pertanto, al fine di determinare il profilo agonista/antagonista recettoriale delle molecole sintetizzate, nonché per determinarne un'attività sul tratto gastrointestinale, è stata valutata la capacità di tali molecole di inibire le contrazioni indotte da serotonina nell'ileo di ratto, che, al pari di quello umano, esprime recettori 5-HT_{2A}. I risultati di tale saggio, relativi ai derivati a nucleo N'-cianopicolinamidinico (**4d**, **4l**, **4m**, **4n**, **4o**) ed isonicotinico (**7a-v** e **8a-v**), espressi come EC₅₀, sono riportati nelle Tabelle 13, 14 e 15.

Dall'analisi dei risultati ottenuti, si evince che la maggior parte dei composti sintetizzati ha mostrato un'attività antagonista, con valori di EC₅₀ nell'ordine del μM. Il composto dotato di maggiore attività antagonista è risultato essere il derivato **8m** (EC₅₀=1.22x10⁻⁸M), caratterizzato dalla presenza di un sostituito 3,4-diclorofenilico sull'anello piperazinico e da un *linker* propilenico tra lo *scaffold* piperazinico stesso ed il nucleo isonicotinico.

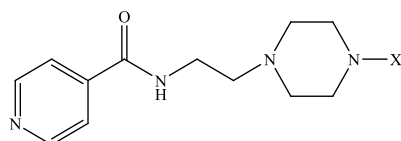
Tabella 13. EC₅₀ dei composti **4d**, **4l**, **4m**, **4n** e **4o** nei confronti delle contrazioni nell'ileo di ratto indotte da serotonina 10⁻⁵ M.

Comp.	X	Numero esperimenti	EC ₅₀ (95% Confidence Intervals)
4d		6	1.00x10 ⁻⁵ (2.93x10 ⁻⁶ -3.12x10 ⁻⁴) M
4l		6	3.34x10 ⁻⁶ (1.63x10 ⁻⁷ -2.29x10 ⁻⁵) M
4m		6	1.95x10 ⁻⁵ (4.43x10 ⁻⁶ -2.13x10 ⁻⁴) M
4n		6	1.49x10 ⁻⁶ (4.51x10 ⁻⁸ -4.91x10 ⁻⁵) M
4o		6	8.71x10 ⁻⁷ (1.22x10 ⁻⁷ -6.18x10 ⁻⁶) M

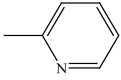
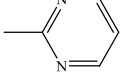
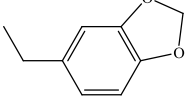
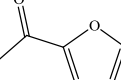
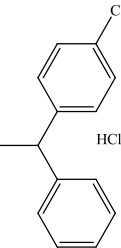
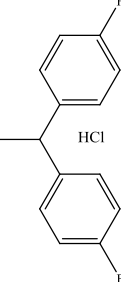
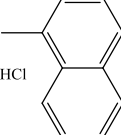
Nelle stesse condizioni, la Ketanserina, utilizzata come termine di confronto, ha mostrato una EC₅₀ pari a 6.44x10⁻¹⁰M.

Altri derivati caratterizzati da un profilo di antagonismo recettoriale sono il composto **4o** a nucleo N'-cianopicolinamidinico (EC₅₀=8.71x10⁻⁷M), i composti **7n** (EC₅₀=5.87x10⁻⁷M), **7q** (EC₅₀=6.75x10⁻⁷M), **8a**(EC₅₀=3.02x10⁻⁷M), **8d**(EC₅₀=6.19x10⁻⁷M), **8h** (EC₅₀=3.61x10⁻⁷M) e **8s** (EC₅₀=7.11x10⁻⁷M) a nucleo isonicotinico. È da sottolineare come alcuni ligandi, nonostante non siano caratterizzati da un ottimale profilo di affinità nei confronti del sottotipo recettoriale 5-HT_{2A}, abbiano comunque mostrato bassi valori di EC₅₀ nel saggio funzionale e tale apparente discrepanza tra i risultati dei diversi saggi farmacologici può essere giustificata con una differente potenza delle molecole sintetizzate. In ogni caso, come ampiamente ipotizzato, i derivati che nei saggi di *binding* non hanno mostrato affinità nei confronti del sottotipo recettoriale 5-HT_{2A}, non hanno evidenziato alcuna attività nel saggio funzionale.

Tabella 14. EC₅₀ dei composti **7a-v** nei confronti delle contrazioni nell'ileo di ratto indotte da serotonina 10⁻⁵ M.



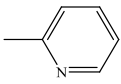
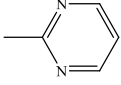
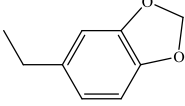
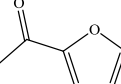
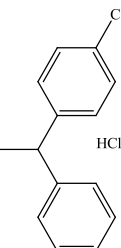
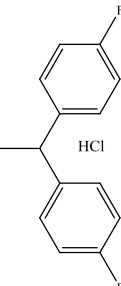
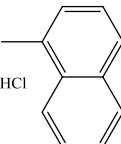
Comp.	X	Numero esperimenti	EC ₅₀ (95% Confidence Intervals)
7a		6	>10 ⁴
7b		6	>10 ⁴
7c		6	>10 ⁴
7d		6	3.85x10 ⁻⁶ (5.21 x10 ⁻⁷ -2.84x10 ⁻⁵) M
7e		6	1.41x10 ⁻⁶ (1.12x10 ⁻⁷ -2.25x10 ⁻⁵) M
7f		6	2.93x10 ⁻⁶ (51.79 x10 ⁻⁸ - 4.796x10 ⁻⁵) M
7g		6	2.16x10 ⁻⁶ (9.52x10 ⁻⁸ -4.89x10 ⁻⁶) M
7h		6	>10 ⁴
7i		6	>10 ⁴
7l		6	>10 ⁴
7m		6	1.17x10 ⁻⁶ (7.68x10 ⁻⁸ -1.80x10 ⁻⁵) M
7n		6	5.87x10 ⁻⁷ (4.48x10 ⁻⁸ -6.32x10 ⁻⁶) M
7o		6	9.83x10 ⁻⁶ (9.92x10 ⁻⁷ -8.36x10 ⁻⁵) M

7p		6	$>10^4$
7q		6	6.75×10^{-7} (5.12×10^{-8} - 7.69×10^{-6}) M
7r		6	2.31×10^{-6} (3.21×10^{-7} - 1.43×10^{-5}) M
7s		6	2.32×10^{-6} (2.48×10^{-7} - 3.58×10^{-5}) M
7t		6	$>10^4$
7u		6	1.03×10^{-5} (1.32×10^{-6} - 2.68×10^{-4}) M
7v		6	1.22×10^{-5} (1.12×10^{-6} - 1.94×10^{-4}) M

Nelle stesse condizioni, la Ketanserina, utilizzata come termine di confronto, ha mostrato una EC_{50} pari a 6.44×10^{-10} M.

Tabella 15. EC₅₀ dei composti **8a-v** nei confronti delle contrazioni nell'ileo di ratto indotte da serotonina 10⁻⁵ M.

Comp.	X	Numero esperimenti	EC ₅₀ (95% Confidence Intervals)
8a		6	3.02x10 ⁻⁷ (3.41x10 ⁻⁸ -2.68x10 ⁻⁶) M
8b		6	>10 ⁴
8c		6	>10 ⁴
8d		6	6.19x10 ⁻⁷ (8.31x10 ⁻⁸ -4.78x10 ⁻⁶) M
8e		6	>10 ⁴
8f		6	>10 ⁴
8g		6	>10 ⁴
8h		6	3.61x10 ⁻⁷ (6.69 x10 ⁻⁸ -1.94x10 ⁻⁶) M
8i		6	1.91x10 ⁻⁶ (2.23 x10 ⁻⁷ -1.63x10 ⁻⁵) M
8l		6	>10 ⁴
8m		6	1.22x10 ⁻⁸ (1.02x10 ⁻⁹ -1.04x10 ⁻⁷) M
8n		6	4.29x10 ⁻⁶ (4.60 x10 ⁻⁷ -4.01x10 ⁻⁴) M
8o		6	1.64x10 ⁻⁶ (2.91x10 ⁻⁷ -9.22x10 ⁻⁴) M

8p		6	6.56×10^{-6} (1.51×10^{-7} - 2.81×10^{-5}) M
8q		6	$>10^4$
8r		6	$>10^4$
8s		6	7.11×10^{-7} (7.97×10^{-8} - 6.91×10^{-6}) M
8t		6	$>10^4$
8u		6	$>10^4$
8v		6	$>10^4$

Nelle stesse condizioni, la Ketanserina, utilizzata come termine di confronto, ha mostrato una EC_{50} pari a 6.44×10^{-10} M.

Nonostante le conoscenze in nostro possesso riguardo la modalità di legame dei ligandi serotoninergici con il recettore 5-HT_{2A} siano ad oggi ancora limitate, è possibile delineare alcune preliminari considerazioni sulle relazioni struttura-attività. Da studi di cristallografia e di dinamica molecolare è stato possibile evidenziare come sia indispensabile, al fine dell'interazione con il recettore, la presenza di una funzione carica positivamente sul ligando serotoninergico che possa interagire con un residuo di Asp-155 presente nella terza elica transmembranaria del recettore. Allo stesso modo, al fine di conferire al ligando un'attività antagonista, risulta fondamentale la presenza di una

ratto presentino tutti i punti farmacoforici caratteristici di un antagonista 5-HT_{2A}, quali un nucleo aromatico opportunamente distanziato mediante una catena alchilammidica dall'anello piperazinico, a sua volta supportante un secondo *scaffold* aromatico variamente sostituito con gruppi accettori di legami a idrogeno. Le sole eccezioni sono rappresentate dai derivati **8a**, **8h**, ed **8m** che non presentano alcun gruppo capace di instaurare legami a idrogeno con la controparte recettoriale, in quanto supportanti un residuo fenilpiperazinico(**8a**), 2-clorofenilpiperazinico (**8h**) e 3,4-diclorofenilpiperazinico (**8m**). Probabilmente in tali derivati il legame a idrogeno con il residuo di Ser-159 non risulta determinante ai fini dell'attività intrinseca, ma piuttosto determina una minore affinità recettoriale, come dimostrato dai risultati dei saggi di *binding* relativi ai composti **8a** (K_i=112 nM) ed **8h** (K_i=92.6 nM). Invece, molto interessante risulta il composto **8m** che, pur non presentando nel suo frammento terminale un gruppo accettore di legami a idrogeno, mostra una buona affinità recettoriale (K_i=1.07 nM) e la maggiore attività antagonista. Tale profilo può essere ascritto ad una migliore accomodazione del ligando all'interno del recettore e ad un corretto bilancio idrofilo/lipofilo della molecola, fattore che, come precedentemente sottolineato, influenza fortemente il legame della molecola al sottotipo recettoriale 5-HT_{2A} [96]. Ulteriori studi sono tuttavia necessari al fine di meglio elucidare la modalità di legame e di conseguenza il profilo di affinità/attività di tale derivato.

Infine, è da sottolineare come, tendenzialmente, i derivati caratterizzati dalla presenza di un *linker* etilenico risultino peggiori antagonisti recettoriali, nonostante alcuni di questi abbiano comunque esibito un ottimo profilo di affinità e selettività verso il recettore 5-HT_{2A}. Appare quindi possibile ipotizzare che la riduzione della lunghezza del ponte metilenico tra il nucleo eterociclico e lo *scaffold* arilpiperazinico si traduca in una

minore flessibilità della molecola e di conseguenza in un diverso profilo di attività intrinseca.

CONCLUSIONI

Durante la mia attività di dottorato mi sono quindi occupato della progettazione e della sintesi di tre nuove serie di derivati piperazinici, caratterizzati dalla presenza di differenti nuclei eterociclici, quali il nucleo N'-cianopicolinamidinico, isonicotinico e picolinico. La prima serie di derivati (**4a-q**), a nucleo N'-cianopicolinamidinico è stata sintetizzata al fine di valutare se una diversa posizione dell'azoto piridinico potesse da sola influenzare l'affinità e la selettività nei confronti dei vari sottotipi recettoriali serotoninergici e dai risultati dei saggi di *binding* è stato possibile evidenziare che la natura del nucleo eterociclico risulta di fondamentale importanza nell'indirizzare l'affinità dei composti verso un particolare sottotipo recettoriale. Infatti, tutti i derivati sintetizzati a nucleo N'-cianopicolinamidinico hanno mostrato un profilo di affinità/selettività verso il sottotipo recettoriale 5-HT_{2A}, in contrapposizione, i derivati a nucleo N'-cianoisonicotinamidinico, precedentemente sintetizzati dal gruppo di ricerca presso cui ho svolto la mia attività di dottorato, mostravano un profilo di affinità/selettività preferenziale verso il sottotipo recettoriale 5-HT_{1A}. Analizzando i risultati dei derivati a nucleo N'-cianopicolinamidinico, i composti **4l** (K_i=0.000185 nM) e **4m** (K_i=0.000778 nM) hanno esibito il miglior profilo di affinità e selettività recettoriale nei confronti del recettore 5-HT_{2A} e possono rappresentare dei *lead compounds* per la sintesi di nuovi ligandi altamente affini e selettivi al sottotipo recettoriale in esame.

Inoltre, al fine di valutare l'influenza della funzione N'-cianoamidinica sul profilo di affinità recettoriale dei ligandi serotoninergici, sono state progettate due nuove serie di derivati, a nucleo isonicotinico (**7a-v** e **8a-v**) ed a nucleo picolinico (**11a-v** e **12a-v**). Tali *scaffold* eterociclici sono stati selezionati in quanto rappresentano una semplificazione molecolare dei corrispondenti nuclei N'-cianoisonicotinamidinico ed N'-cianopicolinamidinico. Confrontando i risultati dei saggi di *binding* dei derivati

isonicotinamidici (**8b-i** e **8p-s**) omologhi dei derivati N'-cianoisonicotinamidinici è possibile evidenziare come, tendenzialmente, tali derivati conservino un interessante profilo di selettività nei confronti del sottotipo recettoriale 5-HT_{1A}, ma siano caratterizzati da una minore affinità verso il recettore in esame. Tale dato, se confermato anche per i derivati a nucleo picolinico (attualmente sottoposti a valutazione farmacologica), omologhi dei derivati a nucleo N'-cianopicolinamidinico, evidenzerebbe come la differente posizione dell'atomo di azoto nel nucleo eterociclico determini un migliore profilo di selettività recettoriale, mentre la presenza di una funzione N'-cianoamidinica, piuttosto che di una semplice funzione ammidica, conferisca al ligando una maggiore affinità verso il recettore stesso, probabilmente mediante la formazione di un legame a idrogeno supplementare con la controparte recettoriale che meglio orienta la molecola nel sito di legame.

Complessivamente, nelle due serie di derivati a nucleo isonicotinico (**7a-v** e **8a-v**) sono state ottenute molecole altamente affini e selettive verso il sottotipo recettoriale 5-HT_{1A}, altre affini e selettive al sottotipo recettoriale 5-HT_{2A} ed altre ancora caratterizzate da un profilo di affinità/selettività mista 5-HT_{1A}/5-HT_{2C}. In particolare, il composto **8u** (K_i=0.130 nM) ha esibito il migliore profilo di affinità/selettività nei confronti del sottotipo recettoriale 5-HT_{1A}, così come i derivati **7n** (K_i=0.0126 nM), **7u** (K_i=0.00956 nM) e **8q** (K_i=0.00985 nM) hanno mostrato il migliore profilo affinità/selettività nei confronti del recettore 5-HT_{2A}, mentre il ligando **8r** (K_i 5-HT_{1A}=0.0113 nM, K_i 5-HT_{2C}=2.19 nM) ha evidenziato un ottimo profilo di affinità mista 5-HT_{1A}/5-HT_{2C}. Inoltre, i confortanti profili di affinità/selettività verso i recettori serotoninergici in esame mostrati dai derivati N'-cianopicolinamidinici (**4a-q**) ed isonicotinamidici (**7a-v** e **8a-v**) permettono di confermare sia l'importanza del nucleo aromatico, che dello *scaffold* arilpiperazinico,

variamente sostituito e sempre presente nei nuovi ligandi serotoninergici. Altrettanto critica appare la distanza tra il nucleo eterociclico prescelto e lo *scaffold* arilpiperazinico. Infatti, come già ampiamente dimostrato in letteratura [76-85], anche in questo lavoro la distanza ottimale per conferire una più marcata affinità/selettività nei confronti del sottotipo recettoriale 5-HT_{1A} risulta essere rappresentata da un ponte alchilico costituito da tre unità metileniche.

I risultati dei saggi funzionali hanno inoltre confermato una correlazione tra l'affinità verso il sottotipo recettoriale 5-HT_{2A} di alcune delle molecole sintetizzate e la loro attività intrinseca. Infatti i derivati che non mostravano alcuna affinità nei confronti del recettore 5-HT_{2A}, sono risultati inattivi nel saggio farmacologico funzionale. Invece, tra i derivati che hanno mostrato affinità verso il sottotipo recettoriale 5-HT_{2A}, alcuni hanno manifestato una spiccata attività antagonista, altri risultano caratterizzati da una minore attività inibente (ascrivibile ad un potenziale profilo di antagonista parziale) ed altri ancora non hanno mostrato alcuna capacità inibitoria nei confronti delle contrazioni indotte da serotonina. In particolare, è da evidenziare come i derivati **8b** e **8l**, pur mostrando ottimi valori di affinità recettoriale, non hanno esibito alcuna capacità di inibire le contrazioni da serotonina nell'ileo di ratto; per tali molecole andrà pertanto verificata un'attività agonista nei confronti dei recettori 5-HT_{2A}.

Pertanto, studi futuri prevedono il completamento della caratterizzazione farmacologica delle serie sintetizzate, in particolar modo dei derivati a nucleo picolinico (**11a-v** e **12a-v**), di cui ad oggi non sono disponibili né i risultati di affinità recettoriale, né quelli relativi all'attività farmacologica intrinseca. Inoltre, è plausibile ipotizzare la possibilità di verificare l'attività intrinseca anche per quelle molecole che si sono dimostrate affini e selettive verso i sottotipi recettoriali 5-HT_{1A} e per i derivati che hanno

invece mostrato un'affinità mista 5-HT_{1A}/5-HT_{2C}. Infatti, come già riportato precedentemente, i recettori 5-HT_{1A} e 5-HT_{2C} sono coinvolti in una serie di processi fisiologici e fisiopatologici a livello del Sistema Nervoso Centrale, in particolare gli agonisti del recettore 5-HT_{1A} (flesinoxan, buspirone) trovano impiego nel trattamento dei disturbi depressivi, mentre molecole dotate di attività mista 5-HT_{1A}/5-HT_{2C} (clozapina, olanzapina) vengono utilizzati come antipsicotici atipici nel trattamento dei disturbi bipolari.

Concludendo, gli interessanti risultati ottenuti da tale ricerca, accompagnati da ulteriori studi farmacologici e di *Molecular Modeling*, consentiranno di meglio approfondire sia le relazioni struttura-attività delle molecole sintetizzate, sia il potenziale impiego terapeutico dei ligandi serotoninergici nel trattamento delle patologie in cui risultano coinvolti la serotonina ed i suoi recettori.

BIBLIOGRAFIA

1. Erspamer, V. *Handbook Exp.Pharmacol.* **1966**, 19, 132-181.
2. Nichols, D.E.; Nichols, C.D. Serotonin receptors. *Chem. Rev.* **2008**, 108, 1614-1641.
3. Sanders-Bush, E.; Mayer, S.E. 5-Idrossitriptamina (serotonina): agonisti e antagonisti dei recettori. *Le basi farmacologiche della terapia*. Goodman and Gilman, **2006**.
4. Essman, W.B. Serotonin distribution in tissues and fluids. *Availability, Localization and Disposition*. **1977**, 1, 15-179.
5. Garattini, S.; Valzelli, L. *Serotonin*. **1965**.
6. Baumgarten, H.G.; Lachenmayer, L.; Schlossberger, H.G. Evidence for a degeneration of indole amine containing nerve terminals in rat brain, induced by 5,6-dihydroxytryptamine. *Zellforsch Mikrosk Anat.* **1972**, 125(4), 553-569.
7. Baumgarten, H.G.; Björklund, A.; Holstein, A.F.; Nobin, A. Chemical degeneration of indolamine axons in rat brain by 5,6-dihydroxytryptamine. An ultrastructural study. *Zellforsch Mikrosk Anat.* **1972**, 129(2), 256-271.
8. Dahlstrom, A.; Fuxe, K. *Acta Physiol. Scand.* **1964**, 232 (62), 1-55.
9. Fuxe, K.; Jonsson, G. Further mapping of central 5-hydroxytryptamine neurons. *Serotonin-New Vistas*. **1974**, 1-12.
10. Blundel, J.E. Serotonin manipulations and the structure of feeding behaviour. *Appetite* **1986**, 7, 39-56.
11. Makino, M.; Saiki, C.; Ide, R.; Matsumoto, S. Role of rostral medulla in serotonin-induced changes of respiratory rhythm in newborn rat brainstem-spinal cord preparations. *Neurosci. Lett.* **2014**, 559, 127-131.
12. Coppen, A.J.; Doogan, D.P. Serotonin and its place in the pathogenesis of depression. *J. Clin Psychiatry*. **1988**, 49(Suppl), 4-11.
13. Charney, D.S.; Woods, S.W.; Goodman, W.K.; Heninger, G.R. Serotonin function in anxiety. II. Effects of the serotonin agonist MCPP in panic disorder patients and healthy subjects. *Psychopharmacology* **1987**, 92, 14-24.

14. Zohar, J.; Insel, T.R.; Zohar-Kadouch, R.C.; Hill, J.L.; Murphy, D.L. Serotonergic responsivity in obsessive-compulsive disorder. Effects of chronic clomipramine treatment. *Arch. Gen. Psychiatry*. **1988**, 45(2), 167-172.
15. Pudovkina, O.L.; Cremers, T.I.; Westerink, B.H. The interaction between the locus coeruleus and dorsal raphe nucleus studied with dual-probe microdialysis. *Eur. J. Pharmacol.* **2002**, 445, 37-42.
16. Segal, M. Serotonergic innervation of the locus coeruleus from the dorsal raphe and its action on responses to noxious stimuli. *J. Physiol.* **1979**, 286, 401-415.
17. Ortega, J.E.; Mendiguren, A.; Pineda, J.; Meana, J.J. Regulation of central noradrenergic activity by 5-HT₃ receptors located in the locus coeruleus of the rat. *Neuropharmacology*. **2012**, 62, 2472-2479.
18. Retson, T.A.; Van Bockstaele, E.J. Coordinate regulation of noradrenergic and serotonergic brain regions by amygdalar neurons. *J. Chem. Neuroanat.* **2013**, 52, 9-19.
19. Moranta, D.; Barcelóa, P.; Aparicio, S.; Garauc, C.; Sarubbo, F.; Ramis, M.; Nicolaua, C.; Estebana, S. Intake of melatonin increases tryptophan hydroxylase type 1 activity in aged rats: Preliminary study *Exp. Geront.* **2014**, 1-4.
20. De Clerk, F.; van Neuten, J.M.; Reneman, R.S. Platelet-vessel wall interactions: Implication of 5-hydroxytryptamine, *Agents and Actions*, **1984**, 15, 612-626.
21. Peach, M.J.; Loeb, A.L.; Singer, H.A.; Saye, J. Endothelium-derived vascular releasing factor. *Hypertension*, **1985**, 7 suppl. I, 94-100.
22. Moll, J.L.; Brown, C.S. The use of monoamine pharmacological agents in the treatment of sexual dysfunction: evidence in the literature. *J. Sex. Med.* **2011**, 8, 956-970.
23. Burri, A.; Hysi, P.; Clop, A.; Rahman, Q; Spector, T.D. A genome-wide association study of female sexual dysfunction. *PLoS One* **2012**, 7:e35041.
24. Clayton, A.H. Female sexual dysfunction related to depression and antidepressant medications. *Curr. Womens Health Rep.* **2002**, 2, 182-187.
25. Clayton, A.; Keller, A.; McGarvey, E.L. Burden of phase-specific sexual dysfunction with SSRIs. *J. Affect. Disord.* **2006**, 91, 27-32.

26. Gregorian, R.S.; Golden, K.A.; Bahce, A.; Goodman, C.; Kwong, W.J.; Khan, Z.M. Antidepressant-induced sexual dysfunction. *Ann. Pharmacother.* **2002**, *36*, 1577-1589.
27. The IUPHAR Compendium of Receptor characterization and Classification. IUPHAR Media, London, UK, **1998**.
28. Fredriksson, R.; Lagerström, M.C.; Lundin, L.G.; Schiöth, H.B. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol. Pharmacol.* **2003**, *63*(6), 1256-1272.
29. Mylecharane, E.J. The classification of 5-hydroxytryptamine receptors. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **1989**, *16*(6), 517-522.
30. Whitaker-Azmitia, P.M.; Druse, M.; Walker, P.; Lauder, J.M. Serotonin as a developmental signal. *Behav. Brain Res.* **1996**, *73*, 19-29.
31. Singh, J.K.; Chromy, B.A.; Boyers, M.J.; Dawson, G.; Banerjee, P. Induction of the serotonin_{1A} receptor in neuronal cells during prolonged stress and degeneration. *J. Neurochem.* **1996**, *66*, 2361-2372.
32. Hirst, W.D.; Andree, T.H.; Aschmies, S.; Childers, W.E.; Comery, T.A.; Dawson, L.A.; Day, M.; Feingold, I.B.; Grauer, S.M.; Harrison, B.L.; Hughes, Z.A.; Kao, J.; Kelly, M.G.; van der Lee, H.; Rosenzweig-Lipson, S.; Saab, A.L.; Smith, D.L.; Sullivan, K.; Sukoff Rizzo, S.J.; Tio, C.; Zhang, M.Y.; Schechter, L.E. Correlating efficacy in rodent cognition models with in vivo 5-hydroxytryptamine_{1A} receptor occupancy by a novel antagonist, (R)-N-(2-methyl-(4-indolyl-1-piperazinyl)ethyl)-N-(2-pyridinyl)-cyclohexane carboxamide (WAY-101405). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2008**, *325*, 134-145.
33. Fiorino, F.; Severino, B.; Magli, E.; Ciano, A.; Caliendo, G.; Santagada, V.; Frecentese, F.; Perissutti, E. 5-HT_{1A} receptor: an old target as a new attractive tool in drug discovery from Central Nervous System to cancer. *J. Med. Chem.* **2013**, Ahead of print.
34. Sanabria-Bohorquez, S.M.; Biver, F.; Damhaut, P.; Wikler, D.; Veraart, C.; Goldman, S. Quantification of 5-HT(1A) receptors in human brain using p-MPPF kinetic modelling and PET. *Eur. J. Nucl. Med.* **2002**, *29*, 76-81.

35. Albert, P.R.; Le François, B. Modifying 5-HT_{1A} receptor gene expression as a new target for antidepressant therapy. *Front. Neurosci.* **2010**, 4(35), 1-7.
36. Shimizu, S.; Tatara, A.; Imaki, J.; Ohno, Y. Role of cortical and striatal 5-HT_{1A} receptors in alleviating antipsychotic-induced extrapyramidal disorders. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* **2010**, 34, 877-881.
37. Gregoire, L.; Samadi, P.; Graham, J.; Bedard, P.J.; Bartoszyk, G.D.; Di Paolo, T. Low doses of sarizotan reduce dyskinesias and maintain antiparkinsonian efficacy of L-Dopa in parkinsonian monkeys. *Parkinsonism Relat. Disord.* **2009**, 15, 445-452.
38. Bezard, E.; Tronci, E.; Pioli, E.Y.; Li, Q.; Porras, G.; Björklund, A.; Carta, M. Study of the antidyskinetic effect of eltoprazine in animal models of levodopa-induced dyskinesia. *Mov. Disord.* **2013**, 28, 1088-1096.
39. Cattaneo, M.G.; Fesce, R.; Vicentini, L.M. Mitogenic effect of serotonin in human small cell lung carcinoma cells via both 5-HT_{1A} and 5-HT_{1D} receptors. *Eur. J. Pharmacol., Mol. Pharmacol. Sect.* **1995**, 291, 209-211.
40. Dizeyi, N.; Bjartell, A.; Nilsson, E.; Hansson, J.; Gadaleanu, V.; Cross, N.; Abrahamsson, P.A. Expression of serotonin receptors and role of serotonin in human prostate cancer tissue and cell lines. *Prostate* **2004**, 59, 328-336.
41. Siddiqui, E.J.; Thompson, C.S.; Mikhailidis, D.P.; Mumtaz, F.H. The role of serotonin in tumor growth. *Oncol. Rep.* **2005**, 14, 1593-1597.
42. Siddiqui, E.J.; Shabbir, M.; Thompson, C.S.; Mumtaz, F.H.; Mikhailidis, D.P. The role of serotonin (5-HT_{1A} and 5-HT_{1B}) receptors in prostate cancer cell proliferation. *J. Urol.* **2006**, 176, 1648-1653.
43. Lemke, T.L.; Williams, D.A. *Foye's Principi di Chimica Farmaceutica*, quinta ed. italiana, **2011**, 318-319.
44. Siddiqui, E.J.; Shabbir, M.; Thompson, C.S.; Mumtaz, F.H.; Mikhailidis, D.P. Growth inhibitory effect of doxazosin on prostate and bladder cancer cell. Is the serotonin receptor pathway involved? *Anticancer res.* **2005**, 25, 4281-4286.
45. Ullmer, C.; Schmuck, K.; Kalkman, H.O.; Lübbert, H. Expression of serotonin receptor mRNAs in blood vessels. *FEBS Lett.* **1995**, 370, 215-221.
46. Heuring, R.E.; Peroutka, S.J. Characterization of a novel 3H-5-hydroxytryptamine binding site subtype in bovine brain membranes. *J. Neurosci.* **1987**, 7, 894-903.

47. Hoyer, D.; Clarke, D.E.; Fozard, J.R.; Hartig, P.R.; Martin, G.R.; Mylecharane, E.J.; Saxena, P.R.; Humphrey, P.P. International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacol. Rev.* **1994**, 46, 157-203.
48. Sonier, B.; Arseneault, M.; Lavigne, C.; Ouellette, R.J.; Vaillancourt, C. The 5-HT_{2A} serotonergic receptor is expressed in the MCF-7 human breast cancer cell line and reveals a mitogenic effect of serotonin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, 343, 1053-1059.
49. Fiorica-Howells, E.; Hen, R.; Gingrich, J.; Li, Z.; Gershon, M.D. 5-HT_{2A} receptors: location and functional analysis in intestines of wild-type and 5-HT_{2A} knockout mice. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2002**, 282, G877-G893.
50. Li, Z.; Chalazonitis, A.; Huang, Y.; Mann, J.J.; Gross Margolis, K.; Yang, Q.M.; Kim, D.O.; Coté, F.; Mallet, J.; Gershon, M.D. Essential roles of enteric neuronal Serotonin in gastrointestinal motility and the development/survival of enteric dopaminergic neurons. *J. Neurosci.* **2011**, 31(24), 8998-9009.
51. Li, Z.S.; Schmauss, C.; Cuenca, A.; Ratcliffe, E.; Gershon, M.D. Physiological modulation of intestinal motility by enteric dopaminergic neurons and the D₂ receptor: analysis of dopamine receptor expression, location, development, and function in wild-type and knock-out mice. *J. Neurosci.* **2006**, 26, 2798-2807.
52. Rossler, A.S.; Bernabe, J.; Denys, P.; Alexandre, L.; Giuliano, F. Effect of the 5-HT receptor agonist DOI on female rat sexual behavior. *J. Sex. Med.* **2006**, 3, 432-441.
53. Nedergaard, P.; Sanchez, C.; Mellerup, E. Different roles of 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors in regulation of female rat paced mating behaviour. *Behav. Brain Res.* **2004**, 149, 151-157.
54. Hillegaart, V.; Ahlenius, S. Facilitation and inhibition of male rat ejaculatory behaviour by the respective 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptor agonists 8-OH-DPAT and anpirtoline, as evidenced by use of the corresponding new and selective receptor antagonists NAD-299 and NAS-181. *Br. J. Pharmacol.* **1998**, 125, 1733-1743.
55. Dryden, S.; Wang, Q.; Frankish, H.M.; Williams, G. Differential effects of the 5-HT_{1B/2C} receptor agonist mCPP and the 5-HT_{1A} agonist flesinoxan on hypothalamic

- neuropeptide Y in the rat: evidence that NPY may mediate serotonin's effects on food intake. *Peptides* **1996**, 17, 943-949.
56. Gatch, M.B. Discriminative stimulus effects of m-chlorophenylpiperazine as a model of the role of serotonin receptors in anxiety. *Life Sci.* **2003**, 73, 1347-1367.
 57. Harada, Y.; Takayama, K.; Ro, S.; Ochiai, M.; Noguchi, M.; Iizuka, S.; Hattori, T.; Yakabi, K. Urocortin1-induced anorexia is regulated by activation of the serotonin 2C receptor in the brain. *Peptides* **2014**, 51, 139-144.
 58. Wade, J.M.; Juneja, P.; MacKay, A.W.; Graham, J.; Havel, P.J.; Tecott, L.H.; Goulding, E.H. Synergistic impairment of glucose homeostasis in ob/ob mice lacking functional serotonin 2C receptors. *Endocrinology* **2008**, 149(3), 955-961.
 59. Berglund, E.D.; Liu, C.; Sohn, J.W.; Liu, T.; Kim, M.H. Lee, C.E.; Vianna, C.R.; Williams, K.W.; Xu, Y.; Elmquist, J.K. Serotonin 2C receptors in pro-opiomelanocortin neurons regulate energy and glucose homeostasis. *J. Clin. Invest.* **2013**, 123(12), 5061-5070.
 60. Heisler, L.K.; Zhou, L.; Bajwa, P.; Hsu, J.; Tecott, L.H. Serotonin 5-HT_{2C} receptors regulate anxiety-like behavior. *Genes, Brain Behav.* **2007**, 6, 491-496.
 61. Talley, N.J.; Phillips, S.F.; Haddad, A.; Miller, L.J.; Twomey, C.; Zinsmeister, A.R.; MacCarty, R.L.; Ciociola, A. GR 38032F (ondansetron), a selective 5HT₃ receptor antagonist, slows colonic transit in healthy man. *Dig. Dis. Sci.* **1990**, 35, 477-480.
 62. Xing, J.H.; Soffer, E.E. Adverse effects of laxatives. *Dis. Colon Rectum.* **2001**, 44, 1201-1209.
 63. Gonzalez-Martinez, M.A.; Ortiz-Olvera, N.X.; Mendez-Navarro, J. Novel pharmacological therapies for management of chronic constipation. *J. Clin. Gastroenterol.* **2014**, 48(1), 21-28.
 64. Gershon, D.; Tack, J. The serotonin signaling system: from basic understanding to drug development for functional GI disorders. *Gastroenterology.* **2007**, 132, 397-414.
 65. Dizeyi, N.; Bjartell, A.; Hedlund, P.; Taskén, K.A.; Gadaleanu, V.; Abrahamsson, P.A. Expression of serotonin receptors 2B and 4 in human prostate cancer tissue and effects of their antagonists on prostate cancer cell lines. *Eur. Urol.* **2005**, 47, 895-900.

66. Lader, M. Psychological effects of buspirone. *J. Clin. Psychiatry*. **1982**, 43, 62-68.
67. Peroutka, S.J. Selective interaction of novel anxiolytics with 5-hydroxytryptamine_{1A} receptors. *Biol. Psychiatry*. **1985**, 20(9), 971-979.
68. Delgado, P.L.; Charney, D.S.; Price, L.H.; Aghajanian, G.L.; Landis, H.; Heninger, G.R. Serotonin function and the mechanism of antidepressant action: reversal of antidepressant-induced remission by rapid depletion of plasma tryptophan. *Arch. Gen. Psychiatry* **1990**, 47, 411-418.
69. Leysen, J.E.; Van Gompel, P.; Verwimp, M.; Niemegeers, C.J.E. Role and localization of serotonin₂ (S₂)-receptor-binding sites: effects of neuronal lesions. *Pharmacology to Behavior*. **1983**, 373-383.
70. Stables, R.; Andrews, P.L.; Bailey, H.E.; Costall, B.; Gunning, S.J.; Hawthorn, J.; Naylor, R.J.; Tyers, M.B. Antiemetic properties of the 5HT₃-receptor antagonist, GR38032F. *Cancer Treat. Rev.* **1987**, 14(3-4), 333-336.
71. Bermudez, J.; Boyle, E.A.; Miner, W.D.; Sanger, G.J. The anti-emetic potential of the 5-hydroxytryptamine₃ receptor antagonist BRL 43694. *Br. J. Cancer*. **1988**, 58(5), 644-650.
72. Mann, D.M.; Yates, P.O. Is the loss of cerebral cortical choline acetyl transferase activity in Alzheimer's disease due to degeneration of ascending cholinergic nerve cells. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. **1982**, 45(10), 936.
73. Bradley, P.B.; Humphrey, P.P.; Williams, R.H. Tryptamine-induced vasoconstrictor responses in rat caudal arteries are mediated predominantly via 5-hydroxytryptamine receptors. *Br. J. Pharmacol.* **1985**, 84(4), 919-925.
74. Connor, H.E.; Humphrey, P.P.A.; Feniuk, W. Serotonin receptors. Therapeutic prospects in cardiovascular disease. *Trends Cardiovasc. Med.* **1991**, 1, 205-210.
75. Schreiber, R.; Opitz, K.; Glaser, T.; De Vry, J. Ipsapirone and 8-OH-DPAT reduce ethanol preference in rats: involvement of presynaptic 5-HT_{1A} receptors. *Psychopharmacology* **1993**, 112, 100-110.
76. Caliendo, G.; Greco, G.; Grieco, P.; Novellino, E.; Perissutti, E.; Santagada, V.; Barbarulo, D.; Esposito, E.; De Blasi, A. Structure-affinity relationship studies on benzotriazole derivatives binding to 5-HT receptor subtypes. *Eur. J. Med. Chem.* **1996**, 31(3), 207-213.

77. Caliendo, G.; Fiorino, F.; Grieco, P.; Perissutti, E.; Santagada, V.; Albrizio, S.; Spadola, L.; Bruni, G.; Romeo, M.R. Synthesis and binding affinities for 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors of a series of 1- and 2-(4-arylpiperazinylalkyl)-4-(benzoyl)-1,2,3-triazole derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **1999**, 34(9), 719-727.
78. Caliendo, G.; Fiorino, F.; Grieco, P.; Perissutti, E.; Santagada, V.; Severino, B.; Bruni, G.; Romeo, M.R. Synthesis of new 1,2,3-benzotriazin-4-one-arylpiperazine derivatives as 5-HT_{1A} serotonin receptor ligands. *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, 8(3), 533-538.
79. Fiorino, F.; Severino, B.; De Angelis, F.; Perissutti, E.; Frecentese, F.; Massarelli, P.; Bruni, G.; Collavoli, E.; Santagada, V.; Caliendo, G. Synthesis and in-vitro pharmacological evaluation of new 5-HT_{1A} receptor ligands containing a benzotriazinone nucleus. *Arch. Pharm. (Weinheim)* **2008**, 341(1), 20-27.
80. Caliendo, G.; Fiorino, F.; Perissutti, E.; Severino, B.; Gessi, S.; Cattabriga, E.; Borea, P.A.; Santagada, V. Synthesis by microwave irradiation and binding properties of novel 5-HT_{1A} receptor ligands. *Eur. J. Med. Chem.* **2001**, 36(11-12), 873-886.
81. Caliendo, G.; Fiorino, F.; Perissutti, E.; Severino, B.; Scolaro, D.; Gessi, S.; Cattabriga, E.; Borea, P.A.; Santagada, V. A convenient synthesis by microwave heating and pharmacological evaluation of novel benzoyltriazole and saccharine derivatives as 5-HT_{1A} receptor ligands. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2002**, 16(1-2), 15-28.
82. Fiorino, F.; Perissutti, E.; Severino, B.; Santagada, V.; Cirillo, D.; Terracciano, S.; Massarelli, P.; Bruni, G.; Collavoli, E.; Renner, C.; Caliendo, G. New 5-hydroxytryptamine_{1A} receptor ligands containing a norbornene nucleus: synthesis and in vitro pharmacological evaluation. *J. Med. Chem.* **2005**, 48(17), 5495-5503.
83. Frecentese, F.; Fiorino, F.; Perissutti, E.; Severino, B.; Magli, E.; Esposito, A.; De Angelis, F.; Massarelli, P.; Nencini, C.; Viti, B.; Santagada, V.; Caliendo, G. Efficient microwave combinatorial synthesis of novel indolic arylpiperazine derivatives as serotonergic ligands. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, 45(2), 752-759.
84. Fiorino, F.; Severino, B.; De Angelis, F.; Perissutti, E.; Magli, E.; Frecentese, F.; Esposito, A.; Massarelli, P.; Nencini, C.; Santagada, V.; Caliendo, G. New 5-HT_{1A} receptor ligands containing a N'-cyanoisonicotinamidinium nucleus: synthesis and in

- vitro pharmacological evaluation. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, 20(9), 2978-2982.
85. Fiorino, F.; Severino, B.; Magli, E.; Perissutti, E.; Frecentese, F.; Esposito, A.; Incisivo, G.M.; Ciano, A.; Massarelli, P.; Nencini, C.; Santagada, V.; Caliendo, G. New potent 5-HT_{2A} receptor ligands containing an N'-cyanopicolinamidine nucleus: synthesis and in vitro pharmacological evaluation. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, 47, 520-529.
 86. Nakajima, T.; Nakajima, S.; Izawa, T.; Kashiwabara, T.; Munezuka, Y. Cyanoamidines. II. Synthesis and pharmacological activity of N-arylalkyl-N'-cyano-3-pyridinecarboxamidines. *Chem. Pharm. Bull.* **1994**, 42(12), 2483-2490.
 87. Sauv , G.; Rao, V.S.; Lajoie, G.; Belleau, B. Backbone-modified oligopeptidic bioregulators. The synthesis and configuration of thioamide, amidoxime, cyanoamidine, and amidrazone analogs of the chemotactic peptide N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (f-Met-Leu-Phe-OR) *Can. J. Chem.* **1985**, 63, 3089-3101.
 88. Cheng, Y.; Prusoff, W.H. Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol.* **1973**, 22(23), 3099-3108.
 89. Scatchard, G. The attraction of proteins for small molecules and ions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1949**, 51, 660-672.
 90. Schlegel, J.R.; Peroutka, S.J. Nucleotide interactions with 5-HT_{1A} binding sites directly labeled by [3H]-8-hydroxy-2-(DI-n-propylamino)tetralin ([3H]-8-OH-DPAT). *Biochem. Pharmacol.* **1986**, 35(12), 1943-1949.
 91. Herndon, J.L.; Ismaiel, A.; Ingher, S.P.; Teitler, M.; Glennon, R.A. Ketanserin analogues: structure-affinity relationships for 5-HT₂ and 5-HT_{1C} serotonin receptor binding. *J. Med. Chem.* **1992**, 35(26), 4903-4910.
 92. Billard, W.; Ruperto, V.; Crosby, G.; Iorio, L.C.; Barnett, A. Characterization of the binding of 3H-SCH 23390, a selective D-1 receptor antagonist ligand, in rat striatum. *Life Sci.* **1984**, 35(18), 1885-1893.
 93. Creese, I.; Schneider, R.; Snyder, S.H. 3H-Spiroperidol labels dopamine receptors in pituitary and brain. *Eur. J. Pharmacol.* **1977**, 46(4), 377-381.

94. Greengrass, P.; Bremner, R. Binding characteristics of 3H-prazosin to rat brain alpha-adrenergic receptors. *Eur. J. Pharmacol.* **1979**, 55(3), 323-326.
95. Perry, B.D.; U'Prichard, D.C. [3H]rauwolscine (alpha-yohimbine): a specific antagonist radioligand for brain alpha 2-adrenergic receptors. *Eur. J. Pharmacol.* **1981**, 76(4), 461-464.
96. Parker, M.A.; Kurrasch, D.M.; Nichols, D.E. The role of lipophilicity in determining binding affinity and functional activity for 5-HT_{2A} receptor ligands. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, 16, 4661-4669.
97. Monte, A.P.; Marona-Lewicka, D.; Parker, M.A.; Wainscott, D.B.; Nelson, D.L.; Nichols, D.E. Dihydrobenzofuran analogues of hallucinogens. 3. Models of 4-substituted (2,5-dimethoxyphenyl)alkylamine derivatives with rigidified methoxy groups. *J. Med. Chem.* **1996**, 39(15), 2953-2961.
98. Shih, J.C.; Chen, K.; Gallaher, T.K. Structure and function of serotonin 5-HT₂ receptors. *NIDA Res. Monogr.* **1994**, 146, 284-296.
99. Pardo, L.; Weinstein, H. On the structure and activity of membrane receptors: a computational simulation of ligand-triggered activation in a model 5-HT_{1A} receptor. *Int. J. Quant. Chem.* **1997**, 63(3), 767-780.
100. Zlatović, M.V.; Sukalović, V.V.; Schneider, C.; Roglić, G.M. Interaction of arylpiperazine ligands with the hydrophobic part of the 5-HT_{1A} receptor binding site. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, 14(9), 2994-3001.
101. Heinrich, T.; Bottcher, H.; Bartoszyk, G.D.; Greiner, H.E.; Seyfried, C.A.; van Amsterdam, C. Indolebutylamines as selective 5-HT_{1A} agonists. *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 4677-4683.
102. Heinrich, T.; Bottcher, H.; Gericke, R.; Bartoszyk, G.D.; Anzali, S.; Seyfried, C.A.; Greiner, H.E.; van Amsterdam, C. Synthesis and structure-activity relationship in a class of indolebutylpiperazines as dual 5-HT_{1A} receptor agonists and serotonin reuptake inhibitors. *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 4684-4692.
103. Kuemmerle, J.F.; Murthy, K.S.; Grider, J.R.; Martin, D.C.; Makhoulf, G.M. Coexpression of 5-HT_{2A} and 5-HT₄ receptors coupled to distinct signaling pathways in human intestinal muscle cells. *Gastroenterology*, **1995**, 109(6), 1791-1800.

104. Bronowska, A.; Les, A.; Chilmonczyk, Z.; Filipek, S.; Edvardsen, O.; Ostensen, R.; Sylte, I. Molecular dynamics of buspirone analogues interacting with the 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} serotonin receptors. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 881-895.